

**Das gehirnspezifische Protein TMP 83.5:
Isolierung und Bestimmung der zellulären Lokalisation**

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Angela Maria Oberthür
aus Frankfurt am Main

Berichterstatter:

Prof. Dr. H. G. Gassen

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. P. Friedl

Tag der Einreichung:

12. Dezember 2001

Tag der mündlichen Prüfung:

4. Februar 2002

Darmstadt 2002

D 17

Die experimentelle Durchführung dieser Arbeit erfolgte in der Zeit von Februar 1996 bis Mai 2000 am Institut für Biochemie des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. H. G. Gassen.

Herrn Prof. Dr. H. G. Gassen möchte ich für die interessante Aufgabenstellung und die immer währende Unterstützung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. P. Friedl bin ich sehr dankbar für die Übernahme des Koreferats. Außerdem danke ich ihm und seiner Arbeitsgruppe für die freundliche Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops und des ELISA-Readers.

Dem Land Hessen danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Layer für die Möglichkeit, die Gewebeschnitte und ein Teil der mikroskopischen Aufnahmen in seinem Arbeitskreis durchzuführen und besonders seinem Mitarbeiter Herrn Dr. Andrée Rothermel für die Einführung in die Welt der Kryogewebeschnitte.

Herrn Prof. Dr. D. Drenckhahn vom Anatomischen Institut der Universität Würzburg möchte ich für die Unterstützung bei der Interpretation der *in situ*-Hybridisierungen danken.

Herrn Prof. P. Kugler vom Anatomischen Institut der Universität Würzburg bin ich sehr dankbar dafür, dass er mir die Gelegenheit geboten hat, in seinem Arbeitskreis *in situ*-Hybridisierungen an Rattengehirnen durchzuführen.

Herzlich danken möchte ich Herrn Florian Fuchs für das Engagement während seiner Hauptvertiefung und Diplomarbeit.

Frau Regina Labitzke bin ich freundschaftlich sehr verbunden für ihre herzliche Unterstützung, ihre unerschütterliche Geduld sowie viele anregende Gespräche.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sowie des gesamten Instituts, die mich auf meinem Weg begleitet haben. Besonders danken möchte ich dabei Frau S. Perl für die gute Zusammenarbeit, ihre große Hilfsbereitschaft und zahlreiche Diskussionen und Gespräche auch über das Projekt 83.5 hinaus.

Und nicht zuletzt bin ich meinen Eltern und meiner gesamten Familie unendlich dankbar für die liebevolle Unterstützung während meiner Krankheit sowie für die zahlreichen Ermutigungen, nicht aufzugeben. Ihnen und besonders meinem Ehemann Markus ist diese Arbeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Das menschliche Gehirn	3
2.1.1 Der Hirnstamm	5
2.1.2 Das Diencephalon	9
2.1.3 Das Telencephalon	10
2.2 Die Blut-Hirn-Schranke	16
2.3 Vom „expressed sequence tag“ zum Protein: Das Projekt 83.5	20
2.4 Aufgabenstellung	26
3 Materialien	27
3.1 Chemikalien	27
3.2 Enzyme und Proteine	28
3.3 Immunglobuline	28
3.4 Inhibitoren	29
3.5 Nukleotide, Oligonukleotide, DNA und RNA	29
3.6 Chromatographiematerial	29
3.7 Spezielle Materialien	30
3.8 Verwendete Membranen und Filter	30
3.9 Geräte und sonstige Materialien	30
3.10 Bakterien	32
3.11 Plasmide	32
3.11.1 Plasmid pGem-T, Promega	32
3.11.2 Zur <i>in vitro</i> -Transkription verwendete rekombinante Plasmide	33
3.12 Sequenzdatenbanken	35
3.13 Größenstandards	35
3.14 Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen	38

4	Methoden	40
	<i>4A Molekularbiologische Methoden</i>	40
4A.1	Sterilisation von Lösungen, Medien und Geräten	40
4A.2	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	40
4A.3	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> DH5α-Zellen	40
4A.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> DH5α-Zellen	41
4A.5	Präparation von Plasmid-DNA	42
4A.5.1	Analytische Plasmidpräparation	42
4A.5.2	Präparation von Plasmid-DNA mittels QIAGEN [®] -Säulen	42
4A.6	Isolierung von RNA aus Gewebe	43
4A.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA	44
4A.6.2	Isolierung von mRNA	45
4A.7	Synthese von cDNA aus mRNA	45
4A.8	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	46
4A.9	Reinigung von Nukleinsäuren	47
4A.9.1	Phenolextraktion von DNA-haltigen Lösungen	47
4A.9.2	Reinigung von DNA-haltigen Lösungen mit Qiaquick-Säulen	47
4A.9.3	Präzipitation von Nukleinsäuren	47
4A.10	Nachweis von Nukleinsäuren	48
4A.10.1	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
4A.10.2	Native Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von DNA	48
4A.10.3	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von RNA	49
4A.11	Enzymatische Modifikation von DNA	49
4A.11.1	DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen	49
4A.11.2	Ligation von PCR-generierten DNA-Fragmenten	50
4A.12	Sequenzierung von DNA	50

4A.13	Hybridsierungstechniken	51
4A.13.1	Northern Blot-Analyse von RNA	52
4A.13.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung an Gewebeschnitten	54
4A.13.2.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden	55
4A.13.2.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Oligonukleotiden	56
4B	<i>Proteinchemische Methoden</i>	57
4B.1	Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen	57
4B.1.1	UV-spektroskopische Bestimmung von Proteinkonzentrationen	57
4B.1.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test	57
4B.1.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	58
4B.2	Konzentrierung von Protein-Lösungen	59
4B.2.1	Konzentrierung mittels Ultrafiltration	59
4B.2.2	Konzentrierung durch Acetonfällung	59
4B.3.	Änderung der Pufferbedingungen von Protein-Lösungen	60
4B.3.1	Dialyse von Protein-Lösungen	60
4B.3.2	Gelpermeationschromatographie von Protein-Lösungen	60
4B.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Protein-Lösungen	61
4B.5	Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	63
4B.5.1	Silberfärbung von Proteinen	63
4B.5.2	Standard-Coomassie Blau-Färbung	64
4B.5.3	Coomassie Blau-Färbung nach Neuhoff	64
4B.6	Elektrotransfer und Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen	65
4B.6.1	Western Blot nach Khyse-Anderson	65
4B.6.2	Färbung von Nitrozellulose-Membranen mit Ponceau S	66
4B.6.3	Coomassie-Blau-Färbung von PVDF-Membranen	66
4B.7	Präparation von cytosolischen und membranständigen Proteinen aus Schweinegewebe	66
4B.7.1	Gewebeaufschluss	66
4B.7.2	Fraktionierter Gewebeaufschluss nach Whiting und Lindstrom	67
4B.7.3	Solubilisierung der homogenisierten Membranfraktion des Gehirnaufschlusses	68

4C Immunologische Methoden	69
4C.1 Lagerung von Seren und Antikörpern	69
4C.2 Isolierung von Immunglobulinen G (IgGs) aus Kaninchenserum	69
4C.2.1 Isolierung von IgGs an Protein A-Agarose	69
4C.2.2 Isolierung spezifischer IgGs aus Kaninchenserum	70
4C.3 Immobilisierung von IgGs an eine Agarosematrix	71
4C.4 Affinitätschromatographie zur Isolierung von Proteinen aus Schweinegehirn	72
4C.5 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)	72
4C.5.1 Bestimmung des Antikörpertiters von Immunseren mittels indirektem ELISA	73
4C.5.2 Quantitativer Sandwich-ELISA zur Bestimmung der Serum IgG-Konzentration	74
4C.6 Immunologischer Nachweis von Antigenen auf Blotmembranen	75
4C.7 Immunfluoreszenzanalysen an Gewebeschnitten	76
5 Ergebnisse	77
5.1 Sequenzanalyse der Proteine TMP und SP 83.5	77
5.1.1 Analyse des Proteins TMP 83.5	80
5.1.2 Analyse der Proteinisoform SP 83.5	88
5.2 Herstellung TMP / SP 83.5-spezifischer Antikörper	92
5.2.1 Auswahl zur Immunisierung verwendbarer Peptidsequenzen	92
5.2.2 Untersuchung der Peptidspezifität der gewonnenen Immunseren mittels indirektem ELISA	97
5.2.3 Bestimmung der Gesamt-IgG-Konzentration der Immunseren mittels quantitativem ELISA	100

5.3	Identifizierung und Isolierung des Transmembranproteins TMP 83.5 aus Schweinegehirn	101
5.3.1	Western Blot-Analyse zum Nachweis des membranständigen Proteins TMP 83.5 im Schweinegehirn	101
5.3.2	Isolierung des Transmembranproteins TMP 83.5 aus Schweinegehirn	105
5.3.2.1	Herstellung einer Peptid AO1-Affinitätssäule	105
5.3.2.2	Immunselektion von anti-AO1-Antikörpern an Peptid AO1-Agarose	106
5.3.2.3	Herstellung einer TMP 83.5-spezifischen Immunaaffinitätssäule	110
5.3.2.4	Isolierung von TMP 83.5 aus solubilisierten Membranen des Schweinecerebellums	111
5.4	Versuche zur Identifizierung der löslichen Isoform SP 83.5 und deren Isolierung aus Schweinegehirn	115
5.4.1	Western Blot-Analyse zum Nachweis von SP 83.5 im Schweinegehirn	115
5.4.2	Immunaaffinitätschromatographie von cytosolischen Schweinehirnaufschlüssen	119
5.4.2.1	Herstellung einer Peptid AO2-Affinitätssäule	120
5.4.2.2	Immunselektion der anti-AO2-Antikörper an Peptid AO2-Agarose	120
5.4.2.3	Herstellung einer SP 83.5-spezifischen Immunaaffinitätssäule	122
5.4.2.4	Versuch der Isolierung von SP 83.5 aus Schweinekleinhirn mittels Immunaaffinitätschromatographie	123
5.5	<i>In situ</i>-Hybridisierung zur zellulären Lokalisation der Transkripte des Gens 83.5	130
5.5.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter cRNA	130
5.5.1.1	Herstellung von 83.5-spezifischen cRNA-Sonden	130
5.5.1.2	<i>In situ</i> -Hybridisierungen von Schweinegehirnschnitten	137
5.5.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung unter Verwendung eines an alkalische Phosphatase gekoppelten Oligonukleotids	149
6	Diskussion	153
7	Literatur	169
8	Anhang	185

*"Ich lebe mein Leben in wachsenden Ringen,
die sich über die Dinge ziehn.
Ich werde den letzten vielleicht nicht vollbringen,
aber versuchen will ich ihn."*

Rainer Maria Rilke

1 Zusammenfassung

Das Gehirn – mit Abstand das komplexeste Organ höherer Wirbeltiere – bewältigt seine unterschiedlichen Aufgaben durch die Ausbildung komplizierter neuronaler Netzwerke, die aus einer Vielzahl differenzierter Nervenzellen bestehen. Die jeweilige Spezialisierung der Neuronen ist dabei durch ihr Proteinrepertoire bedingt, das somit ihre individuelle Funktion im Gehirn gewährleistet. In der Vergangenheit wurde oftmals versucht, gehirnspezifische Proteine über die Isolierung ihrer mRNA-Sequenzen zu identifizieren. Diese Projekte sowie die jüngsten Sequenzierungsprogramme zur Entschlüsselung kompletter Genome führten jedoch hauptsächlich zu einem enormen Anstieg der Zahl unbekannter Transkriptsequenzen, denen keinerlei Funktion zugeordnet werden konnte, ohne dabei gleichzeitig die Charakterisierung neuartiger Proteinfamilien zu beschleunigen. In Anbetracht dieser Problematik sind strategische Lösungsansätze, wie sie in unserem Arbeitskreis am Beispiel des gehirnspezifisch exprimierten Gens 83.5 verfolgt wurden, aktueller denn je.

Ausgehend von einem cDNA-Fragment unbekannter Funktion, das im Verlauf eines Programmes zur Identifizierung Blut-Hirn-Schranke-spezifischer Proteine isoliert wurde, konnten zwei bisher noch nicht beschriebene mRNA-Sequenzen (tmp und sp 83.5) charakterisiert werden, die ausschließlich im Gehirn gebildet werden. Die Transkripte kodieren möglicherweise für ein noch nicht beschriebenes potenzielles Membranprotein (TMP 83.5) sowie für dessen lösliche Isoform SP 83.5. Auf dem Weg vom unbekannten cDNA-Fragment zum Protein sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nun die Identifizierung der beiden Proteine sowie deren Isolierung erfolgen. Ergänzend dazu sollte mittels *in situ*-Hybridisierungen an Gehirnschnitten das genaue zelluläre Vorkommen der beiden Transkripte aufgeklärt werden.

Zum Nachweis der beiden Zielproteine im nativen Gewebe wurden zunächst peptidspezifische Immunsereen generiert. Nach Ableitung zweier geeigneter Peptidsequenzen aus der AS-Sequenz der hypothetischen Proteine TMP und SP 83.5 wurden hierzu Kaninchen mit den entsprechenden synthetischen Peptiden immunisiert. Die sich anschließende Charakterisierung der resultierenden Immunsereen ergab, dass sich beide Seren durch eine hohe Spezifität bezüglich des jeweils als Antigen eingesetzten synthetischen Peptids auszeichneten.

Unter Verwendung des für die lösliche Isoform spezifischen Immunsereums konnte jedoch weder in Western Blot-Analysen noch in Immunaффinitätschromatographien das Protein SP 83.5 im Schweinegehirn nachgewiesen werden. Kontrollversuche ergaben, dass das Immunsereum trotz seiner Spezifität für das zur Immunisierung verwendete

Peptid das native Protein nicht erkennt, so dass über dessen tatsächliches Vorkommen keine Aussagen getroffen werden können.

Ganz im Gegenteil dazu erwies sich das TMP-spezifische Antiserum als hervorragend geeignet, das vermutliche Transmembranprotein in Western Blot-Analysen von Membranfraktionen des Schweinegehirns nachzuweisen. Darüber hinaus konnte unter Verwendung der peptidspezifischen Antikörper, die aus den Rohseren mittels Affinitätschromatographie gewonnen wurden, eine Immunaффinitätssäule generiert werden, die schließlich erstmals die Isolierung von TMP 83.5 ermöglichte. Die Etablierung dieses effektiven Reinigungssystems stellt somit die Grundlage für eine zukünftige experimentelle Funktionsanalyse dar.

Die durchgeführten *in situ*-Hybridisierung zur Bestimmung des proteinbildenden Zelltyps zeigten weiterhin erstmals, dass die Transkripte tmp und sp 83.5 von den unterschiedlichsten Neuronentypen in der Groß- und Kleinhirnrinde des Schweins gebildet werden. Eine besonders starke Färbung zeigte sich dabei in der Körnerschicht des Kleinhirns sowie in den drei äußeren Schichten der Großhirnrinde. Die Bildung beider Transkripte in den Hirnkapillarendothelzellen, dem zellulären Sitz der Blut-Hirn-Schranke, konnte dagegen aufgrund dieser Ergebnisse letztendlich ausgeschlossen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Vorgehensweise ermöglichte somit die Charakterisierung eines neuartigen, neuronalen Transmembranproteins, bei dem es sich basierend auf den ebenfalls durchgeführten computergestützten Sequenzanalysen um ein Rezeptormolekül bzw. um die Untereinheit eines größeren Rezeptorkomplexes in Nervenzellen handeln könnte. Unterstützt wird diese Annahme durch die Identifizierung von potenziellen Glycosylierungs- und Phosphorylierungsstellen, die möglicherweise an der Ligandenbindung und Signalweiterleitung dieses Proteins beteiligt sind.

Basierend auf der Entschlüsselung des humanen Genoms ermöglichten Datenbankabgleiche schließlich die Identifizierung des humanen Transkripts tmp 83.5. Interessanterweise ist es auf Chromosom 10 in einem Genbereich lokalisiert, der im engen Zusammenhang mit neuronalen Fehlfunktion, wie z. B. einer erblichen Variante der Epilepsie, zu stehen scheint.

2 Einleitung

2.1 Das menschliche Gehirn

"In unseren Köpfen sitzt die wohl komplizierteste Struktur im ganzen Universum. Die etwa drei Pfund schwere Gewebemasse, die wir Gehirn nennen, hat es dem Menschen ermöglicht, hochorganisierte Staatssysteme hervorzubringen, seinen Fuß auf den Mondboden zu setzen und Kunstwerke von überragender Schönheit zu schaffen."

Richard F. Thompson, "Das Gehirn"

Bewusste Wahrnehmung, Gefühle, Verhalten und Denken basieren auf dem sicherlich komplexesten menschlichen Organ, dem Gehirn. Gemeinsam mit dem Rückenmark bildet es die übergeordnete "Kommandozentrale" unseres Körpers - das Zentralnervensystem (ZNS).

Auch wenn wir von einer detaillierten Beschreibung der zugrundeliegenden neuronalen Netzwerke noch weit entfernt sind, so hat unser Wissen über den anatomischen Aufbau und die Organisation des Gehirns einen beachtlichen Umfang erreicht, das zumindest ein Verstehen der fundamentalen Prinzipien erlaubt.

Während der Embryonalentwicklung bildet sich das humane Gehirn ausgehend vom Neuralrohr des 3-Blasen-Stadiums (Abb. 2.1 und Tab. 2.1). Basierend auf diesen entwicklungsgeschichtlichen Aspekten unterscheidet man dabei die drei folgenden unterschiedlichen Bereiche:

Das *Rhombencephalon* (Rautenhirn) setzt sich aus der Medulla oblongata (verlängertes Mark) und dem *Metencephalon* (Hinterhirn) zusammen, das sich in Pons (Brücke) und dem dorsal liegenden Cerebellum (Kleinhirn) differenziert.

Das *Mesencephalon* (Mittelhirn) bildet zusammen mit dem Rhombencephalon den Hirnstamm und stellt dessen kleinste Komponente dar.

Das *Prosencephalon* (Vorderhirn) besteht aus dem *Telencephalon* (Endhirn) sowie aus dem den Thalamus bildenden *Diencephalon* (Zwischenhirn). Dabei leiten sich aus dem Endhirn die Strukturen der Großhirnhemisphären sowie der darunterliegenden Kerne, die Basalganglien, der Hippocampus und die Amygdala ab.

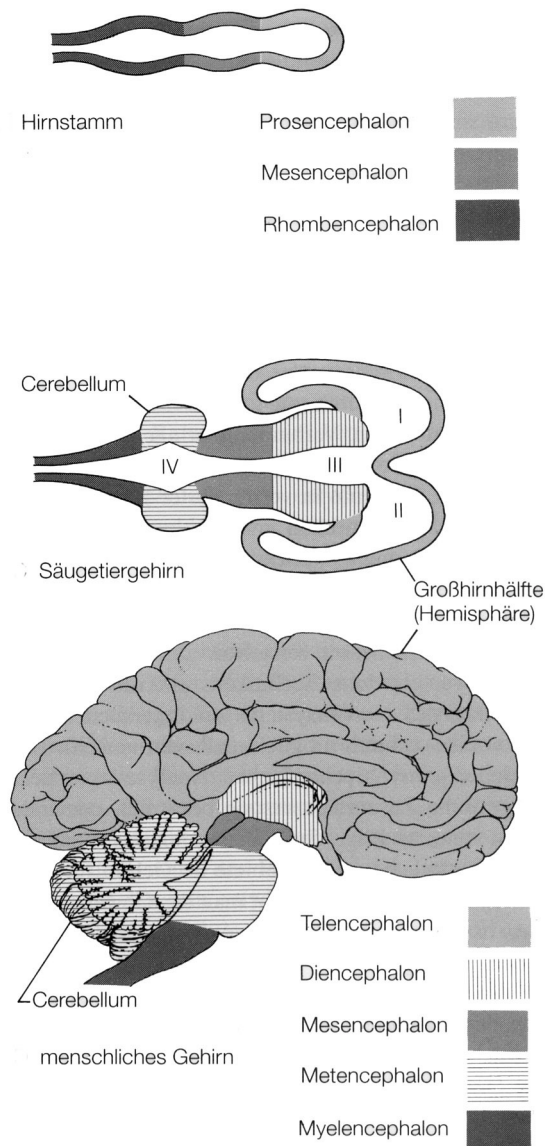


Abb. 2.1 Entwicklung des Säugetiergehirns (Kolb and Whishaw, 1993). Aus dem vorderen (anterioren) Abschnitt des Neuralrohrs entwickeln sich die verschiedenen Bereiche des Säugetiergehirns sowie das Ventrikelsystem.

Daneben bildet sich aus dem anterioren Bereich des vom Neuralrohr umschlossenen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum (Zentralkanal) das Ventrikelsystem des Gehirns, das die Cerebrospinalflüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis*) enthält. Im Säugetiergehirn existieren vier Ventrikelhohlräume, die alle über kurze Röhrenstrukturen miteinander in Verbindung stehen. So sind die paarig angeordneten Seitenventrikel des Telencephalon (Ventrikel I und II) über das *Foramen Monroi* mit dem dritten Ventrikel des Diencephalon verbunden, der wiederum durch den *Aquaeductus mesencephali* mit dem vierten Ventrikel im Rhombencephalon kommuniziert. Diese das gesamte Gehirn umspülende Liquorflüssigkeit wird zum größten Teil von den die Ventrikel

auskleidenden Adergeflechten (*Plexus chorioidei*) produziert. Der zell- und proteinarme Liquor versorgt das Hirngewebe mit ausreichenden Mengen an Mineralien und Nährstoffen. Über Öffnungen im vierten Ventrikel tritt der Liquor aus dem Ventrikelsystem in die knöcherne Schädelkapsel und umspült dadurch auch die gesamte äußere Gehirnoberfläche. Diese Einlagerung des Gehirns in eine Flüssigkeit bietet weitgehend Schutz vor mechanischen Einwirkungen und verringert durch die Auftriebskraft das Gehirngewicht entscheidend

2.1.1 Der Hirnstamm

Das Rhombencephalon bildet zusammen mit dem Mesencephalon eine kontinuierliche Struktur, den Hirnstamm. Dieser Bereich hat sich früh in der Evolution entwickelt und ist bezüglich Struktur und Organisation von den Fischen bis zum Menschen erstaunlich konserviert geblieben. Fast alle der lebenserhaltenden Funktionen des Organismus wie Atmung, Blutdruck, Herzschlag, Darmfunktion sowie Schluck- und Hustenreiz werden von hier kontrolliert und gesteuert. Die meisten der 12 Hirnnerven verlassen beziehungsweise erreichen das Gehirn in diesem Bereich, wie z. B. der *Nervus vagus*, der Herz und andere innere Organe kontrolliert, oder der die Gesichtsmuskulatur innervierende *Nervus facialis*. Zu den Aufgaben der Hirnnerven gehören die Weiterleitung von sensorischen Impulsen aus den niederen Sinnesorganen des Kopfbereiches, die Versorgung der Kopf- und Halsmuskulatur mit motorischen Impulsen sowie die Informationsweiterleitung sensorischer Impulse höherer Sinnesorgane zu übergeordneten Gehirnarealen.

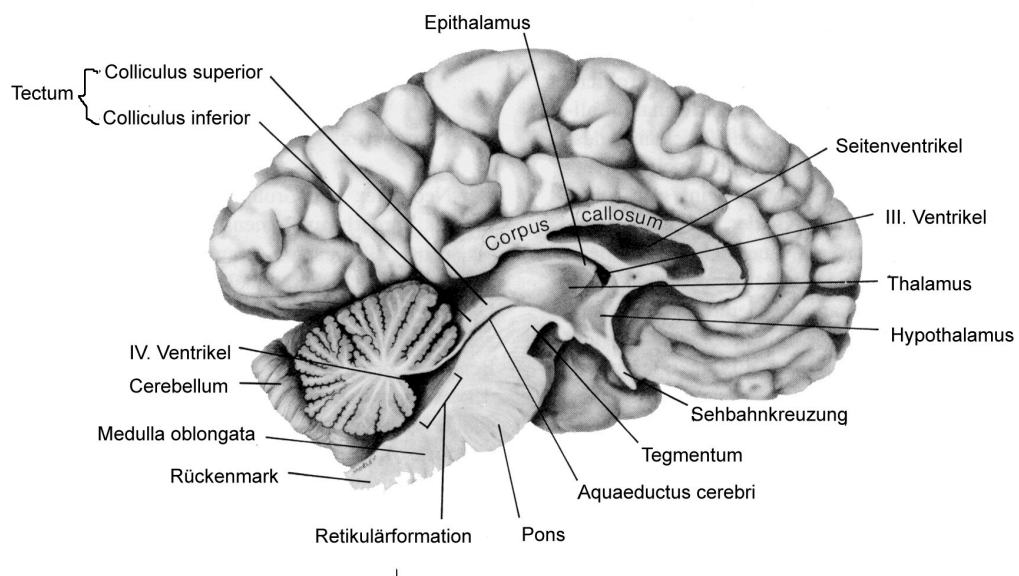


Abb. 2.2 Medianer Sagittalschnitt des menschlichen Gehirns (Kolb and Whishaw, 1993)

Der Hirnstamm besteht aus Medulla oblongata, Pons, Kleinhirn und Mittelhirn. Die Medulla oblongata ist die rostrale Verlängerung des Rückenmarks und enthält alle auf- und absteigenden Nervenbahnen, die sensorische und motorische Information höheren Gehirnregionen zuführen bzw. zur Peripherie leiten. Acht der zwölf Hirnnerven verlassen beziehungsweise münden in diesem Bereich.

Der Medulla schließt sich der Pons an, der ebenfalls auf- und absteigende Faserzüge sowie zahlreiche Kernbereiche enthält, die sich durch eine erhöhte Ansammlung von spezifischen Neuronen auszeichnet. So liegen die Kerne des *Nervus trigeminus*, der unter anderem Nahrungsaufnahme und Gesichtsausdruck kontrolliert, in der Region des Pons. Bis hin zum Zwischenhirn erstreckt sich über den gesamten Hirnstamm ein Netzwerk von miteinander in Verbindung stehenden Neuronen, das als Rektikulärformation bezeichnet wird. Die Aufgaben dieses Systems sind noch nicht vollständig aufgeklärt, es scheint jedoch eine Mittlerfunktion im Zusammenhang mit Bewusstsein und Aufmerksamkeit zu spielen.

Drei-Blasen-Stadium	Fünf-Blasen-Stadium	ausgereifter Zustand	dazugehöriger Hohlraum
1. Vorderhirn Prosencephalon	1a. Telencephalon (Endhirn)	Großhirnrinde, Basalganglien, Hippocampus, Amygdala, Thalamus, Hypothalamus	Seitenventrikel
	1b. Diencephalon (Zwischenhirn)	Sehnerven, Sehbahnen	Dritter Ventrikel
2. Mittelhirn Mesencephalon	2. Mesencephalon (Mittelhirn)	Tectum, Tegmentum	Aquaeductus cerebri
3. Rautenhirn Rhombencephalon	3a. Metencephalon (Hinterhirn)	Pons Cerebellum	Vierter Ventrikel
	3b. Myelencephalon (Nachhirn)	Medulla oblongata	Vierter Ventrikel

Tab. 2.1 Übersicht der wichtigsten Gehirnabschnitte im embryonalen und ausgereiften Zustand

Dorsal zu Pons und Medulla oblongata liegt das Cerebellum (Kleinhirn), dessen Vorderfläche das Dach des vierten Ventrikels bildet. Das Kleinhirn besteht aus zwei Hemisphären mit stark gefurchter Oberfläche, die über den *Vermis cerebelli* (Wurm) miteinander verbunden sind. Durch die Furchung entstehen die charakteristischen, querverlaufenden Windungen (*Folia cerebelli*) der Kleinhirnrinde, die im Querschnitt (Abb. 2.2) den Eindruck vermitteln, die weiße Substanz des Cerebellums würde wie ein Baum in die graue Substanz der Kleinhirnrinde wachsen.

Neben diesem anatomischen Charakteristikum weist die Kleinhirnrinde auch auf zellulärer Ebene eine besondere Schichtung der Neuronen auf, die in Abb. 2.3 als Neuronenfärbung sowie in schematischer Form dargestellt ist.

Die etwa 1 mm dicke Kleinhirnrinde besteht von außen nach innen aus der *Molekularschicht* (*Stratum moleculare*), der *Purkinje-Zellschicht* (*Stratum gangliosum*), sowie der *Körnerschicht* (*Stratum granulosum*). Darunter liegt im Inneren der Kleinhirnwindung die schmale Schicht weißer Substanz.

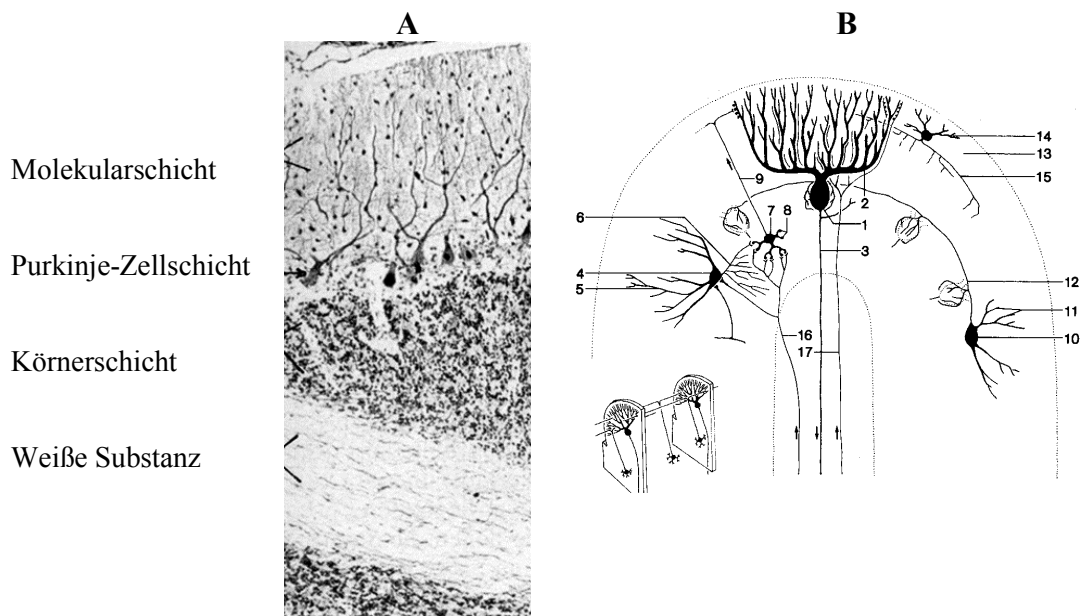


Abb. 2.3 Zellulärer Aufbau des Cerebellums. (A) Versilberung eines Kleinhirnschnittes nach Bodian, 70 fache Vergrößerung. (B) Schematische Darstellung der Kleinhirnrinde mit den darin vorkommenden Nervenzelltypen, die bei einer Versilberung nach Bodian angefärbt werden: 1. Purkinje-Zelle mit Dendritenbaum (2) und Axon (3), 4. Golgizelle mit Dendriten (5) und Axon (6), 7. Körnerzelle mit Dendriten (8) und Axon (9), das sich in der Molekularschicht aufteilt und parallel zur Windung läuft (Detailabbildung). 10. Korbzelle mit Dendriten (11) und Axon (12), 13. Sternzelle mit Dendriten (14) und Axon (15). Die Moosfasern (16) und Kletterfasern (17) sind die zwei afferenten Eingangssysteme, während die Axone der Purkinje-Zellen das einzige inhibitorische Ausgangssystem der Kleinhirnrinde darstellen. Das verkleinerte Schema in B gibt die räumliche Anordnung des Dendritenbaums der Purkinje-Zellen und den Verlauf der Körnerzell-Axone wider.

Nahe der Oberfläche der Kleinhirnrinde liegen die Sternzellen, deren stark verzweigte Dendriten bis zu den afferenten Kletterfasern reichen. Ihr Axon durchquert die Kleinhirnwindung und bildet inhibitorische Synapsen an den Dendriten der benachbarten Purkinje-Zellen. Außerdem befinden sich in der Molekularschicht die

sogenannten Korbzellen, die an der Grenze zur Purkinje-Zellschicht angeordnet sind. Ihre Dendriten breiten sich in der Molekularschicht aus, während die Axone horizontal über der Purkinje-Zellschicht verlaufen und Abzweigungen (Kollaterale) bilden, die die Purkinje-Zellen korbartig umschließen. Dabei kann eine einzige Korbzelle mit bis zu 9 Purkinje-Zellen kommunizieren.

Im darunterliegenden *Stratum gangliosum* liegen die 30 µm großen Purkinje-Zellen mit ihren charakteristischen birnenförmigen Zellkörpern. Aufgereiht wie auf eine Perlenschnur säumen sie die darunter liegende Körnerschicht. Die Purkinje-Zellen repräsentieren die "Ausgangsstation" der Kleinhirnrinde, da alleine ihre Axone über die graue Substanz hinaus reichen und bis in die weiße Substanz zu den Kleinhirnkernen ziehen. Dort werden sie vor allem zum Großhirn verschaltet. Ihr stark verzweigter Dendritenbaum breitet sich wie ein Fächer nach oben in der Molekularschicht aus und kann über 200 000 synaptische Kontakte besitzen. Exitatorische Signale erhalten die Purkinje-Zellen einmal über die afferenten Kletterfasern, die aus der Medulla entspringen und zum Anderen über die Parallelfasern der Körnerzellaxone, die parallel zu den Furchen des Kleinhirns verlaufen und dabei die Dendritenfächer mehrerer hundert Purkinje-Zellen durchqueren.

Mit 2.7 Millionen Zellen pro Kubikmillimeter stellen die Körnerzellen der Körnerschicht die häufigsten Nervenzellen des Gehirns dar. Sie bilden die "Eingangsstation" für sensorische Impulse aus dem Rückenmark, dem Pons und den Kernen des Gleichgewichtsnerven, die über die Moosfaser weitergeleitet werden. Die Körnerzellen selbst verschicken ihre Impulse über ihr in die Molekularschicht reichendes Axon, das sich dort in die Parallelfaser aufteilt (Detailabbildung in Abb. 2.3). Außerdem bilden die Moosfasern exitatorische Synapsen mit den ebenfalls in der Körnerschicht liegenden Golgi-Zellen, die in viel geringerer Zahl unterhalb der Purkinje-Zellschicht liegen. Die Golgi-Zellen besitzen stark verzweigte Dendriten, die bis in die Molekularschicht reichen, sowie ein durch Kollateralenbildung büschelförmiges Axon, das sich stark zwischen den Körnerzellen verzweigt. Es wird vermutet, dass sie durch ihre inhibitorischen Synapsen die allgemeine Aktivität in der äußeren Schicht modulieren.

Das Cerebellum koordiniert die Feinmotorik von komplexen Bewegungsabläufen und gewährleistet damit den glatten Ablauf von komplexen Bewegungen. Nicht nur Bewegungen, die ein hohes Maß an Präzision und Geschicklichkeit verlangen, wie es z. B. Musiker für ein perfektes Beherrschen ihres Instruments benötigen, sondern auch scheinbar einfach erscheinende Handbewegungen, wie das Ergreifen eines Kugelschreibers, verlangen einen flexiblen, an die Situation anpassungsfähigen Zeitplan der Muskelbewegung. Diese Aufgabe erfüllt das Kleinhirn, indem es sensorische Informationen über die Stellung und Bewegung der Gliedmaßen aus dem Rückenmark

sowie über das Gleichgewicht und die allgemeine Lage des Körpers im Raum aus dem Vestibularsystem empfängt und diese mit motorischen Signalen aus der Großhirnrinde verknüpft. Die resultierenden Signale werden kontinuierlich an die Großhirnrinde geleitet, die den Bewegungsablauf entsprechend dem Signal-Input anpasst. Im letzten Jahrzehnt konnte mit Hilfe von computertomografischen Verfahren gezeigt werden, dass das Kleinhirn bei Aufgaben, die assoziative Leistungen verlangen, eine stärkere Aktivität aufweist als bei rein motorischen. Inwieweit es jedoch tatsächlich eine wichtige Aufgabe bei der Wahrnehmung übernimmt, ist aber keinesfalls vollständig aufgeklärt und wird äußerst kritisch diskutiert (Heck und Sultan, 2001).

Die kleinste Komponente des Hirnstamms, das Mesencephalon, differenziert sich zum über dem *Aquaeductus cerebri* liegenden Tectum sowie dem darunter liegenden Tegmentum. Im Gegensatz zu weniger hochentwickelten Tieren, bei denen das Tectum die höchste visuelle und auditorische Schaltzentrale darstellt, ist es bei den Säugern weniger stark entwickelt, da sich diese Systeme im Neocortex befinden. Über die zwei Kernpaare *Colliculi superiores* und *inferiores* werden hier Körperbewegungen koordiniert, die im Zusammenhang mit Seh- und Hörreizen stehen. Im Tegmentum befinden sich die Kerne der Hirnnerven III-V, die u.a. für die direkte Kontrolle der Augenbewegung verantwortlich sind, sowie zahlreiche auf- und absteigende Nervenbahnen, die obere und untere Gehirnbereiche miteinander verbinden. Außerdem befinden sich in dieser Region die motorischen Kerne *Nucleus ruber* und *Substantia nigra*, die eine entscheidende Rolle bei der Bewegungskontrolle zu spielen scheinen, so weisen Parkinson-Patienten beispielsweise eine Degeneration von Neuronen im Bereich der *Substantia nigra* auf.

Der Hirnstamm repräsentiert somit die vegetative Ebene unseres Gehirns, d. h. die unterste Kontrollstation unseres Körpers, die für die unbewusste Lebenserhaltung sowie Bewegungssteuerung verantwortlich ist.

2.1.2 Das Diencephalon

Unterhalb der beiden Seitenventrikel liegt das Zwischenhirn zwischen dem Mittelhirn und den beiden Großhirnhälften. Es ist aus drei übereinander liegenden Schichten aufgebaut: dem Epithalamus, dem Thalamus sowie den Hypothalamus.

Der Epithalamus gliedert sich in die *Habenula*, eine Schaltstelle für Impulse der Riechbahn, und die zapfenförmige *Epiphyse* (Zirbeldrüse), die an der Hinterwand des III. Ventrikels oberhalb der Vierhügelplatte lokalisiert ist. Es wird angenommen, dass der Epithalamus an der Steuerung biologischer Rhythmen beteiligt ist und u. a. durch die rhythmische Freisetzung des neurosekretorischen Hormons Melatonin den Wach- und Schlafzustand des Körpers reguliert.

Der Thalamus ist die Hauptumschaltzentrale des Säugetiergehirns. Fast alle vom Hirnstamm kommenden sensorischen Informationen werden hier verarbeitet und zum Telencephalon weitergeleitet. Man unterscheidet dabei den dorsalen Thalamus, über dessen verschiedene Kerngruppen fast alle aufsteigenden sensorischen Bahnen zu jeweils ganz bestimmten Cortexarealen projiziert werden, vom ventralen Thalamus, dem Umschaltzentrum der Seh- und Hörbahnen. Einzig das olfaktorische System wird nicht über den Thalamus verarbeitet, sondern projiziert direkt zum Cortex. Alle Kerngebiete des Thalamus sind über die als Stabkranz bezeichneten Faserzüge mit der Großhirnrinde verbunden. Zusätzlich verlaufen Nervenfasern zum Kleinhirn, Pallidum, Striatum sowie dem Hypothalamus.

Der Hypothalamus ist das übergeordnete Steuerorgan zahlreicher vegetativer Funktionen sowie die oberste Schaltstelle der endokrinen Drüsen. So wirkt er über vegetative Nerven direkt auf Drüsen und Zellen und steuert die Hormonausschüttung des Vorderlappens der Hypophyse, auch Adenohypophyse genannt. Die Adenohypophyse ist eine echte endokrine Drüse, die über die Ausschüttung einer Vielzahl von Hormonen wiederum die Tätigkeit anderer endokriner Drüsen steuert. Die Freisetzung dieser Hormone wird über neurosekretorische Zellen des Hypothalamus gesteuert, die sogenannte Steuerhormone an das Gefäßnetz der Adenohypophyse abgegeben. Durch die Ausschüttung der Hormone Vasopressin und Oxytocin reguliert der Hypothalamus direkt den Blutdruck, den Wasserhaushalt sowie die Kontraktion der glatten Muskulatur. Das Hormon Oxytocin beispielsweise ist für das Einsetzen der Wehen während der Geburt verantwortlich.

Der Hypothalamus ist trotz seiner geringen Größe an fast allen Verhaltensaspekten beteiligt, die im Zusammenhang mit emotionalen Empfindungen stehen.

2.1.3 Das Telencephalon

Die cerebralen Hemisphären (Großhirnhälften) des Telencephalons bilden den größten Teil des humanen Gehirns. Ihre stark vergrößerte Oberfläche ist durch zahlreiche Furchen (Sulci) gekennzeichnet, die die Gehirnwindungen (Gyri) voneinander trennen. Die Hemisphären sind durch eine tiefe Furche, die *Fissura longitudinalis cerebri*, voneinander getrennt und stehen nur über das Corpus callosum (Balken) sowie die Commissura anterior miteinander in Verbindung. Diese Strukturen bestehen aus dicht zusammenliegenden Nervenfasern (Kommissurenfasern), die zu gleichartigen Hirnarealen in beiden Seiten ziehen.

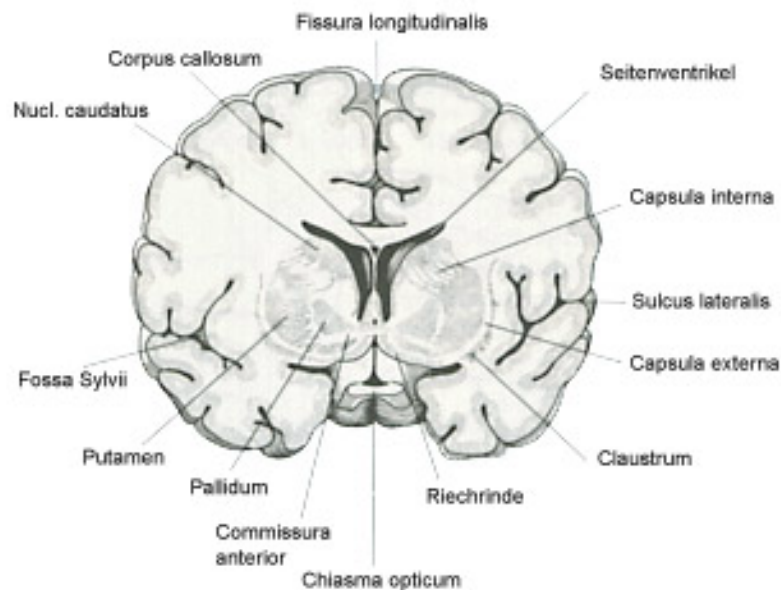


Abb. 2.4 Frontalschnitt durch das Gehirn in Höhe der Commissura anterior, Thews, 1991

Auf der in Abb. 2.4 dargestellten Schnittfläche läßt sich die graue Substanz der Hirnrinde (Neocortex) und der drei subkortikalen Kerne deutlich von der weißen Substanz unterscheiden. Die im Inneren der Hemisphären liegenden Kerne stellen jeder für sich Ansammlungen funktionell miteinander verknüpfter Nervenzellen dar. Unter dem Begriff Basalganglien sind die großen Kerngebiete des Corpus Striatum und des Pallidums zusammengefasst. Das Corpus Striatum stellt eine wichtige Schaltstelle im motorischen System dar und gliedert sich in die Abschnitte *Nucleus caudatus* und *Putamen*, die durch die Faserbahnen der *Capsula interna* voneinander getrennt sind. Die Basalganglien sind in eine motorische Schleife einbezogen, indem sie Informationen aus allen vier Cortexbereichen und dem Thalamus verarbeiten und ihrerseits durch die Informationsweiterleitung über den Thalamus an den frontalen Cortex an der Regulation von Bewegungen beteiligt sind.

Die Kerne *Amygdala* (Mandelkern) und *Hippocampus* sind Teile des limbischen Systems, das das *Corpus callosum* saumartig umgibt. Dort werden Erlebnisinhalte affektiv bewertet und emotionale Reaktionen ausgelöst. Während der Hippocampus eine wichtige Rolle bei der Gedächtnisfunktion des Gehirns spielt, koordiniert der Mandelkern das autonome und endokrine System und beeinflusst das emotionale Empfinden. Über direkte Verschaltungen mit dem Hypothalamus moduliert das limbische System fundamentale physiologische Aktivitäten des Körpers wie den Blutdruck und Herzschlag, wodurch vegetative Körperfunktionen mit dem emotionalen Empfinden verknüpft werden.

Die Großhirnrinde (Neocortex) hat sich im Laufe der Evolution von allen Hirnteilen am meisten vergrößert und stellt beim Menschen etwa 80 % der gesamten Hirnmasse dar.

Abb. 2.5 zeigt die Gliederung des Neocortex in die vier Hirnlappen.

Der Frontallappen reicht vom Stirnpol bis zur Sulcus centralis. Im Gyrus praecentralis und in den benachbarten Regionen des Stirnlappens liegen die primären motorischen Rindenfelder, die die Willkürbewegungen des Körpers über primäre d. h. direkt ins Rückenmark projizierende Neuronen vermitteln. Im Gyrus frontalis inferior des Frontallappens befindet sich das Brocasche Sprachzentrum, das eine wichtige Schaltstelle für die Sprechfunktion des Menschen darstellt.

Hinter dem Sulcus centralis liegt der Parietallappen, in dessen vorderster Windung, dem Gyrus postcentralis, die somatosensorischen Bahnen enden. Dort befinden sich die primären somatosensorischen Rindenfelder, die Informationen von peripheren Rezeptoren erhalten und somit für die somatische Sensibilität verantwortlich sind. Das Lesezentrum des Gehirns, in dem die optische Verarbeitung von geschriebenen Wörtern stattfindet, ist ebenfalls im Parietallappen im Bereich des Gyrus angularis beheimatet.

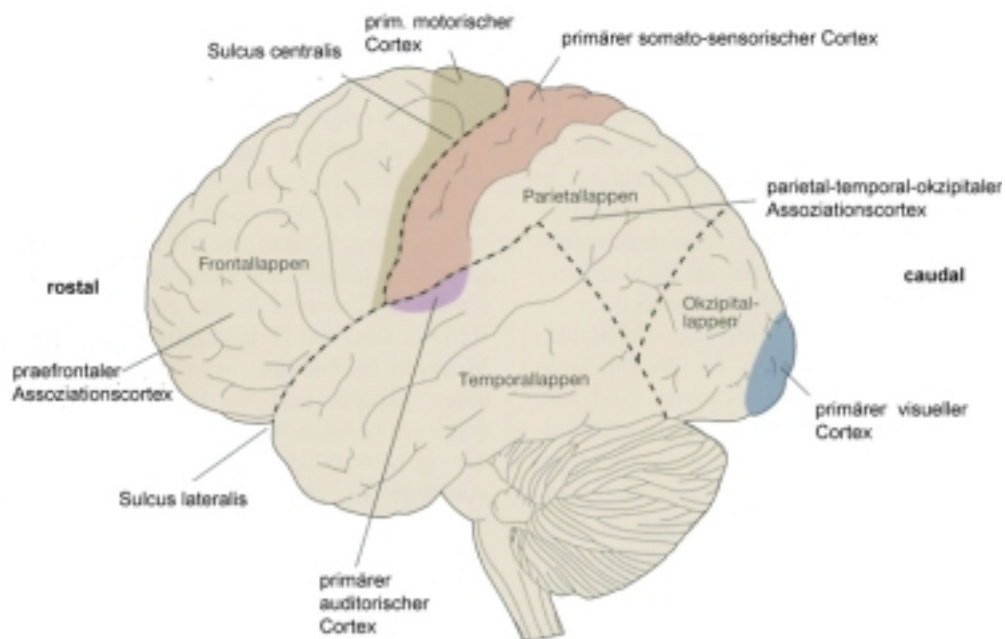


Abb. 2.5 Schematische Seitenansicht der linken Großhirnhälfte nach Kandel, 1996. Der Neocortex gliedert sich in vier Hirnlappen, die nach den über ihnen liegenden Schädelknochen benannt sind. Die Einteilung erfolgte z. T. willkürlich entlang der Verlaufswege der Hauptfurchen.

Der Temporallappen unterhalb des Sulcus lateralis enthält die akustische Primärregion, in der die Hörbahnen enden. In unmittelbarer Nähe dazu befindet sich der für das Sprachverständnis zuständige Rindenbereich, das sensorische Sprachzentrum.

Am caudalen Pol des Okzipitallappens enden die Sehbahnen im Rindenbereich des primären Sehzentrums.

Um die primären Areale herum befinden sich die Rindenfelder höherer Ordnung, in denen komplexe Aspekte von einzelnen Sinnesmodalitäten oder motorischen Funktionen verarbeitet werden. So integrieren die höheren sensorischen Zentren Informationen, die aus den primären sensorischen Gebieten einlaufen, während die höheren motorischen Zentren, die für komplexe Handlungsabläufe notwendigen Informationen an den primären motorischen Cortex senden. Der größte Teil des Neocortex wird bei Primaten von den Assoziationsfeldern eingenommen, die an den wesentlichen kognitiven Hirnfunktionen Wahrnehmung, Willkürbewegungen, emotionales Verhalten, Gedächtnis und Sprache beteiligt sind. Die Assoziationsfelder lassen sich in drei Hauptbereiche gliedern, die jeweils auf eine bestimmte Funktion spezialisiert sind.

Der parietal-temporal-okzipitale Assoziationscortex liegt an der Schnittstelle der drei namengebenden Hirnlappen und ist mit der Verarbeitung der höheren Wahrnehmungsfunktionen betraut. Die in die drei angrenzenden Hirnbereiche einlaufenden primären sensorischen Informationen, z. B. Hören und Sehen, werden dort zur Bildung komplexer Wahrnehmungen wie dem Verständnis von Sprache kombiniert. Der größte Teil des rostralen Frontallappens wird vom präfrontalen Assoziationscortex eingenommen, der hauptsächlich mit der Planung und Durchführung von komplexen willkürlichen Bewegungen beschäftigt ist. Der für die Motivation von Handlungen, emotionalen Bewertungen von Situationen sowie der Gedächtnisfunktion zuständige limbische Assoziationscortex befindet sich in Teilen des Parietal-, Frontal- und Temporallappens. Diese Bereiche empfangen Projektionen von übergeordneten sensorischen Arealen und schicken ihrerseits Fasern zu anderen Cortexbereichen. So beeinflussen emotionale Aspekte über die Verbindung zum präfrontalen Assoziationscortex z. B. die Bewegungsplanung.

Über 90 % der menschlichen Großhirnrinde zeichnen sich durch den charakteristischen, sechsschichtigen Aufbau (Isocortex) aus (Abb. 2.6), in der jede Schicht von einer Neuronenart dominiert wird. Sie ist in einheitsbildende, vertikale Zellsäulen mit einem Durchmesser von 300-500 µm gegliedert. In den Projektionsfeldern der Rinde repräsentiert jede Säule einen umschriebenen Bereich von Sinneszellen, so können z. B. in der Sehrinde bestimmte Zellsäulen einzelnen Retinabezirken zugeordnet werden. Die Zellschichten können in zwei funktionale Gruppen unterteilt werden, wobei die vier äußeren Schichten Axone aus anderen Gehirnarealen erhalten und die beiden inneren Schichten Axone in andere Hirnregionen aussenden.

Die oberflächlich liegende *Molekularschicht* (*Lamina molecularis*) enthält wenige zur Oberfläche parallel ausgerichtete Neuronen (Cajal-Zellen), deren Dendriten zahlreiche kurze und lange Verzweigungen besitzen (Marin-Padilla, 1984) sowie Tangentialfaser (Exner-Streifen), die aus zahlreichen, dünnen Axonen bestehen.

Die *äußere Körnerschicht* (*Lamina granularis externa*) besteht aus dicht liegenden Körnerzellen (Sternzellen).

Die *äußere Pyramidenschicht* (*Lamina pyramidalis externa*) wird aus bis zu 40 µm langen Pyramidenzellen gebildet. Sie zeichnen sich durch einen langen, bis in die Molekularschicht reichenden Spitzendendriten und durch kürzere Basaldendriten aus, von deren dreieckigen Anordnung sich der Name der Neuronen ableitet. Das Axon geht basal aus der Zelle hervor.

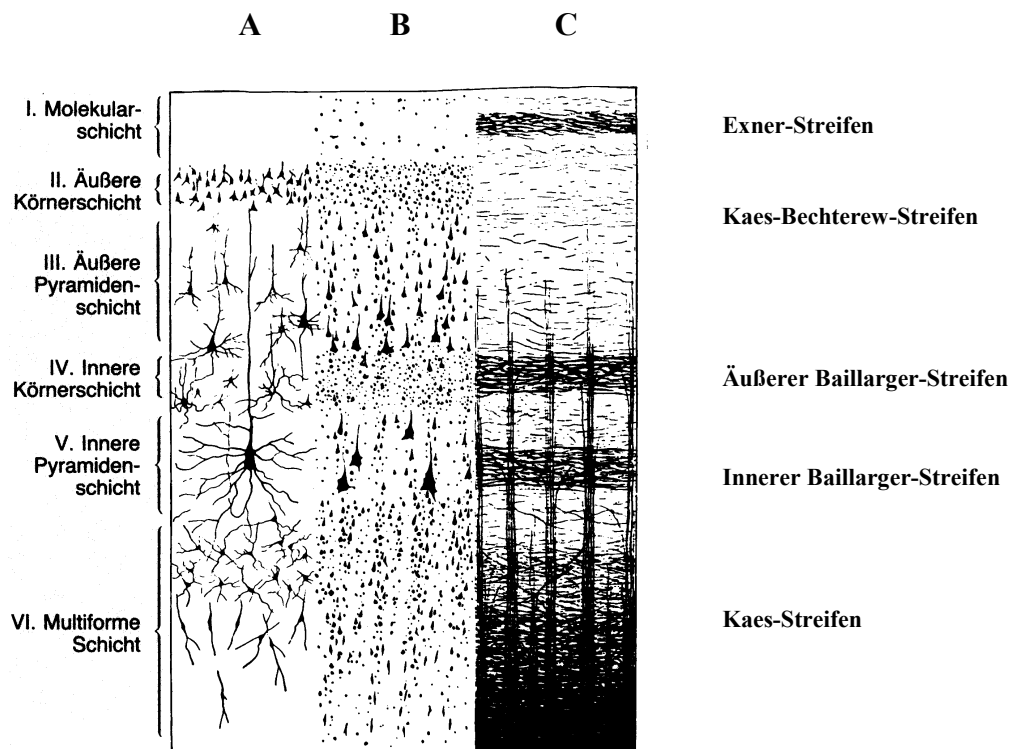


Abb. 2.6 Aufbau der grauen Substanz des humanen Cortex, nach Brodmann, 1909

Anhand drei verschiedener Färbeverfahren wurde der zelluläre Aufbau der sechsschichtigen Hirnrinde dargestellt. **A** Mit der Chromsilber-Imprägnierung werden vereinzelte Nervenzellen komplett mit ihren Fortsätzen angefärbt. **B** zeigt ein typisches Bild einer kompletten Zellfärbung mit Methylenblau, bei der die Nissl-Schollen der Neuronen angefärbt werden. Mit der Markscheide-Färbung **C** wird der Verlauf der Axone im Neocortex sichtbar.

In der *inneren Körnerschicht (Lamina granularis interna)* herrschen Sternzellen vor. Im Gyrus praecentralis fehlt diese Schicht fast nahezu, während sie im Gyrus postcentralis gut entwickelt ist. In der Sehrinde liegt sie noch in weitere Schichten untergliedert vor. Horizontal liegende Faserzüge bilden den äußeren Baillarger-Streifen.

Die *innere Pyramidenschicht (Lamina pyramidalis interna)* enthält die Betzschen Riesenpyramidenzellen, die im Gyrus praecentralis 100 µm Länge erreichen können. Ihre Axone ziehen innerhalb der Pyramidenbahn bis zu den motorischen Hirnnervkernen im Mesen- und Rhombencephalon bzw. bis in das Vorderhorn der Rückenmarkssegmente. Diese Schicht zeichnet sich außerdem durch den inneren Baillarger-Streifen aus.

In der *Spindelschicht (Multiforme Schicht)* findet man unterschiedlich geformte, häufig spindelförmige, größere und kleinere Nervenzellen. Ihre Axone ziehen teils in das Marklager, teils steigen sie in höhere Schichten auf.

Aufgrund der unterschiedlich starken Ausbildung der einzelnen Schichten in verschiedenen Rindengebieten kommt es zu einer weiteren Gliederung der Großhirnrinde, bei der insgesamt bis zu 200 exakt definierte cytoarchitektonische Felder mit unterschiedlichen Funktionen unterschieden werden können. So haben primäre sensorische Gebiete eine große Anzahl von Zellen in Schicht IV, da dort viele sensorische Axone enden und weniger Zellen in Schicht V. Primäre motorische Areale weisen dagegen ein umgekehrtes Verhältnis der Zellenanzahl in diesen Schichten auf, da viele Axone aus Schicht V in subcorticale motorische Systeme reichen. Cortexfelder, die weder primäre motorische noch sensorische Felder sind, weisen hingegen eine größere Zelldichte in den Schichten II und III und weniger Zellen in den Schichten IV und V auf.

2.2 Die Blut-Hirn-Schranke

Das cerebrale Gefäßsystem höherer Wirbeltiere weist eine Vielzahl struktureller und funktioneller Besonderheiten auf, die in ihrer Gesamtheit einen unkontrollierten Stofftransport vom Blut in das Hirngewebe weitgehend unterbinden. Diese physiologische Barriere wird als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet. Die dort lokalisierten hochregulierten Stoffaustausch-Systeme entkoppeln das Gehirn von metabolischen Schwankungen im Blut und gewährleisten somit das für die einwandfreie Funktion der Nervenzellen notwendige stabile innere Milieu (Homöostase).

Elektronenmikroskopische Studien deuteten schon früh darauf hin, dass der anatomische Sitz der BHS auf zellulärer Ebene durch das einschichtige Endothel der Hirnkapillaren repräsentiert wird (Reese and Karnovsky, 1967).

Die Hirnkapillaren unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch bzgl. ihres Enzymrepertoires deutlich von den Kapillaren des restlichen Körpers. Der in Abb. 2.7 dargestellte Querschnitt durch eine Hirnkapillare verdeutlicht einige dieser morphologischen Besonderheiten.

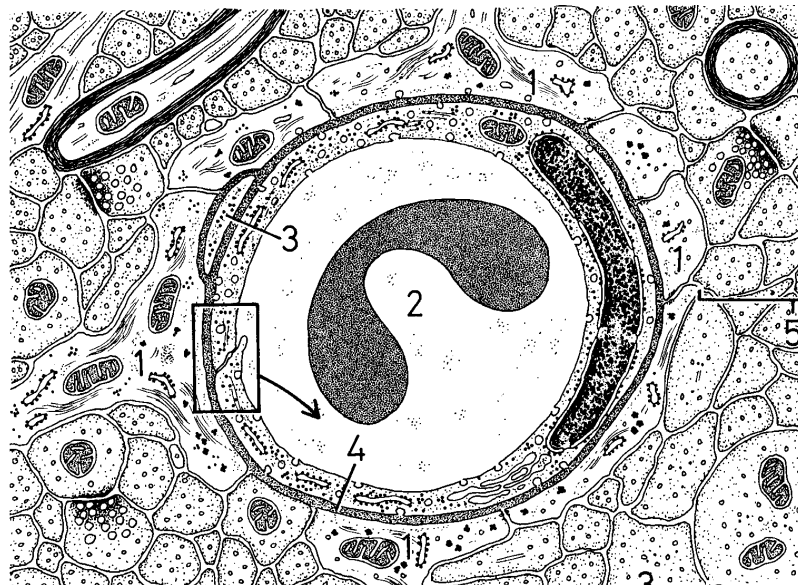


Abb. 2.7 Querschnitt durch eine Hirnkapillare, Krstić, 1984. Die zeichnerische Darstellung entspricht der Ausschnittsvergrößerung B in Abb. 2.8 und zeigt eine cerebrale Kapillare mit Erythrocyt (2) in 10 000 facher Vergrößerung. Die morphologische Besonderheit in Form der durch tight junctions miteinander verbundenen Endothelzellen ist durch das Rechteck hervorgehoben. Fast 20 - 30 % der abluminalen Endothelzelloberfläche ist von Pericyten besetzt (3). Außerdem werden die Kapillaren nahezu vollständig von den Astrocytenfortsätzen (1) bedeckt.

Das Hauptcharakteristikum der cerebralen Kapillaren ist das sie auskleidende einschichtige Endothel, bei dem die einzelnen Zellen lückenlos aneinander liegen. Durch diese festen Zell-Zell-Kontakte, auch tight junctions genannt, wird die unkontrollierte Diffusion von im Blut gelösten Substanzen über den Zellzwischenraum vollständig unterbunden. Der molekulare Aufbau der tight junctions ist bisher nur ansatzweise verstanden, es scheint jedoch, dass ein kompliziertes Netz von miteinander in Verbindung stehenden Transmembran- sowie cytosolischen Proteinen für die Bildung und Aufrechterhaltung dieses BHS-Charakteristikums verantwortlich ist (Furuse et al., 1994).

Das einzige Protein, das bisher an der tight junction-Membran identifiziert werden konnte, ist das integrale Transmembranprotein Occludin, das in Hirnkapillarendothelzellen überexprimiert wird (Furuse et al., 1993). Obwohl Occludin-defiziente Stammzellen in der Lage sind, funktionelle tight junctions auszubilden (Saitou et al., 1998), weisen kürzlich durchgeführte Knock-out-Experimente an Mäusen auf eine komplexe Funktion des Transmembranproteins in der tight junctions - Membran (Saitou et al., 2000) hin. Über die Wechselwirkung mit dem intrazellulär vorkommenden ZO-1 (Stevenson et al., 1986), das selbst wiederum mit ZO-2 (Gumbiner et al., 1991; Schulze et al., 1997) assoziiert ist, scheint Occludin an den Membranbereich der tight junctions verankert zu werden (Mitic and Anderson, 1998). Beide Proteine gehören zur Proteinfamilie der Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (Flanning et al., 1996), die in Vertebraten im allgemeinen an der Organisation von Transmembranprotein-Komplexen beteiligt sind. Die Bildung der Multiproteinkomplexe sowie das Auftreten von Occludin in der tight junctions – Membran wird möglicherweise über den Phosphorylierungsgrad des Transmembranproteins reguliert (Sheth et al., 2000; Hirase et al., 2001). Erst kürzlich konnte die Beteiligung von Protein Kinase C an diesem Prozess nachgewiesen werden (Andreeva et al., 2001).

Auf der dem Gefäßinneren abgewandten Seite (abluminal) sitzt den Hirnkapillarendothelzellen der Zelltyp der Pericyten auf. Diese kontraktilen Zellen sitzen bevorzugt an den Kontaktstellen der Endothelzellen und werden mit diesen von einer gemeinsamen Basalmembran umgeben. Ihre Funktion an den Hirnkapillarendothelzellen konnte bisher nur ansatzweise beschrieben werden; es scheint jedoch, dass beide Zelltypen sich in ihrer Proliferation und Differenzierung gegenseitig beeinflussen (Shepro and Morel, 1993).

Zu den weiteren Besonderheiten der cerebralen Pericyten gehört die Bildung der Enzyme γ -Glutamyltranspeptidase (Frey et al., 1991) und Aminopeptidase N, wodurch auf eine Beteiligung dieses Zelltyps bei Abbau- und Entgiftungsvorgängen an der Blut-Hirn-Schranke geschlossen werden kann (Krause et al., 1993).

Ein weiteres morphologisches Charakteristikum der cerebralen Kapillaren ist die vollständige Bedeckung der abluminalen Oberfläche durch Astrocytenfortsätze. Abb. 2.8 zeigt, wie die aus dem liquorgefüllten Zwischenraum (5) der Hirnhäute *Pia mater* (3) und *Arachnoidea* (4) stammenden Blutgefäße (11) das Hirngewebe innervieren und dabei vollständig in ein sie umfassendes Astrocytennetz eingebettet werden. Dabei werden sie bis zu einer gewissen Gehirntiefe von Ausläufern des bindegewebsreichen *Spatium subarachnoidale*, den Virchow-Robin-Räumen (10), begleitet, bevor sie als kleinste Kapillaren nur noch von den astrocytären Gefäßfüßchen (*Membrana gliae limitans perivascularis* (13)) umgeben werden.

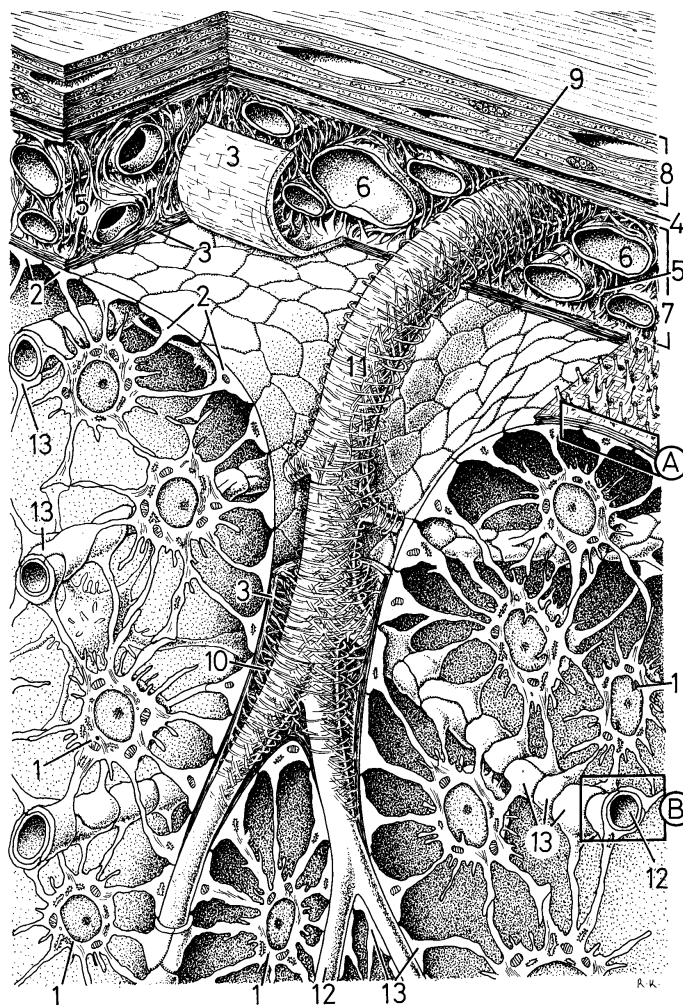


Abb. 2.8 zeigt den engen Kontakt der Astrocyten mit den in das Gehirn eindringenden Blutgefäßen (11) in 1000 facher Vergrößerung. Dargestellt ist der Aufbau der dem Gehirn aufliegenden Hirnhäute, *Dura mater* (8), *Arachnoidea* (4) und *Pia mater* (3) sowie den typischen Verlauf eines aus dem *Spatium subarachnoidale* (7) stammenden Gefäßes (6) auf dem Weg in das neuronale Hirngewebe. Die sternförmigen Astrocyten (1) bilden mit ihren Ausläufern ein dreidimensionales Netzwerk, in das die Neuronen (in dieser Zeichnung nicht dargestellt) und Kapillaren (12) eingelagert sind. B: Kapillarquerschnitt (Abb.2.7). Krstić, 1984.

Zusätzlich schirmen die Astrocyten die gesamte Gehirnoberfläche gegen die umgebenden Hirnhäute ab, indem sie mit ihren Endfüßchen die sogenannte *Membrana Gliae limitans superficialis* (2) bilden. Wie schon der enge anatomische Kontakt der Astrocyten mit den Hirnkapillarendothelzellen vermuten lässt, scheinen diese tatsächlich an der Bildung und Aufrechterhaltung des Phänotyps der Blut-Hirn-Schranke beteiligt zu sein (Cancilla et al., 1993). Ko-Kultivierungsexperimente zeigten, dass die normalerweise während der Zellkultivierung eintretende Dedifferenzierung der Hirnkapillarendothelzellen, die mit dem Verlust der Blut-Hirn-Schranke-Eigenschaften einher geht (Meyer et al. 1990), durch die Astrocyten deutlich verlangsamt wird. Außerdem sind die Astrocyten in der Lage, die Bildung von tight junctions *in vivo* (Janzer und Raff, 1987) und *in vitro* (Rubin et al. 1991) in Endothelzellen anderer Herkunft zu induzieren.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass nicht nur die Endothelzellen alleine für eine funktionstüchtige BHS ausschlaggebend sind, sondern vielmehr das Zusammenspiel all dieser in der Mikroumgebung der cerebralen Kapillaren vorkommenden Zelltypen das Phänomen der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen. Auch die in der Nähe des cerebralen Endothel liegenden Neuronen, deren Assoziation mit dem mikrovaskulären Endothel durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt wurde (Hendry et al., 1983) scheinen dabei eine entscheidende Rolle zu spielen (Cohen et al., 1997).

Die cerebralen Endothelzellen unterscheiden sich jedoch nicht nur morphologisch, sondern vor allem bezüglich ihrer spezifischen intrazellulären Transportsysteme entscheidend von denen des restlichen Körpers. Während der unspezifische Stofftransport mittels pinocytotischer Vesikel in den Hirnkapillarendothelzellen fast vollständig in den Hintergrund tritt, existieren eine Vielzahl BHS-spezifischer Transportsysteme, die entweder der Nährstoffversorgung oder der Entgiftung dienen (Aigner et al., 1997). Dabei werden neben Carrier-vermittelten auch Rezeptor- sowie adsorptiv-vermittelte Transportsysteme genutzt, um die kontinuierliche Nährstoffzufuhr aus dem Blut zu gewährleisten. So deckt das Gehirn den Bedarf an Glucose, seinem Hauptenergielieferanten, durch kontinuierlichen Transport mittels dem Glucosetransportersystem GLUT-1. Unabhängig von der tatsächlichen Glucosekonzentration im Blut gewährleistet dieses Carrierprotein im Zusammenspiel mit den Enzymen Hexokinase und Glucose 6-Phosphatase den fortwährenden Fluß von Glucose ins Gehirn (McAllister et al., 2001). Neben den zahlreichen Versorgungsprozessen existieren an der BHS auch eine Vielzahl von entgiftenden Transportsystemen, bei denen Substanzen aus dem Nervengewebe in die Blutbahn abtransportiert werden. So ist z. B. das BHS-spezifische Transporter P-Glykoprotein an der Entsorgung von hydrophoben Toxinen aus dem Gehirn beteiligt (Greenwood, 1992).

2.3 Vom „expressed sequence tag“ zum Protein: Das Projekt 83.5

Mit dem Ziel, Hirnkapillarendothelzell-spezifische Proteine zu identifizieren und dadurch ein besseres Verständnis über diesen die Blut-Hirn-Schranke repräsentierenden hochdifferenzierten Zelltyp zu erlangen, wurde von Weiler-Güttler, 1988 das Verfahren der subtraktiven Klonierung verwendet. Im Gegensatz zu den in dieser Zeit bevorzugten immunologischen Ansätzen, bei denen Antikörper gegen Endothelzellen oder Membranfraktionen verwendet wurden (Michalak et al., 1986, Krause et al., 1988, Seulberger et al., 1990) sollten mit diesem molekularbiologischen Verfahren BHS-spezifische Proteine durch die Isolierung der sie kodierenden mRNA-Transkripte charakterisiert werden.

Hierfür wurde eine so genannte cDNA-Bank aus Hirnkapillarendothelzellen (BMEC) des Schweins angelegt, die durch ein Subtraktionsverfahren mit BMEC-spezifischen Transkripten angereichert wurde. Abb. 2.9 zeigt das methodische Vorgehen bei der Herstellung dieser subtraktiven cDNA-Bank.

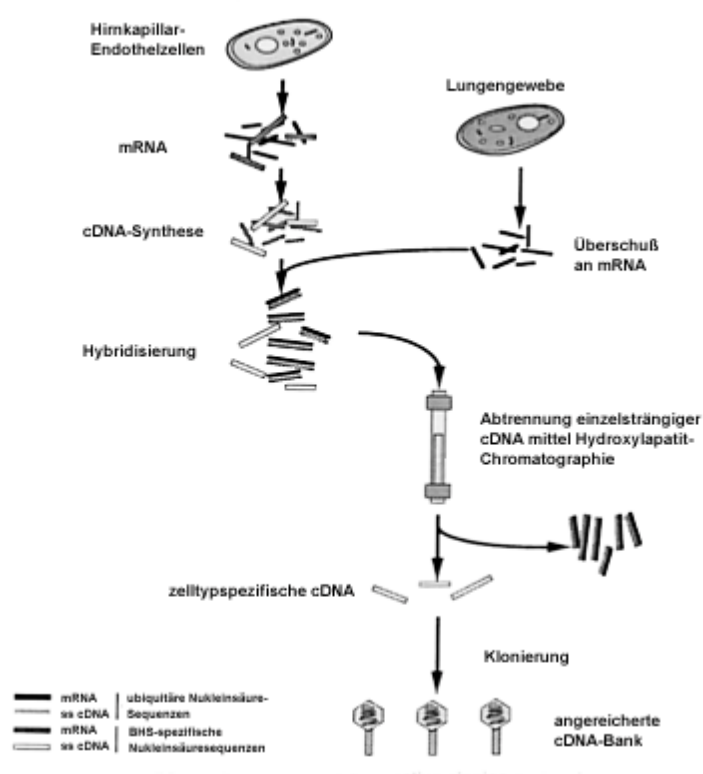


Abb. 2.9 Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank aus Hirnkapillarendothelzellen nach Zinke et al., 1992.

Zunächst wurde die aus porcinen BMEC isolierte messenger RNA (mRNA) durch das Enzym Reverse Transkriptase in einzelsträngige copy DNA (cDNA) überführt. Dabei wird die Hydrolyse-empfindliche mRNA in eine stabilere, komplementäre DNA-Kopie überführt. Um BHS-unspezifische cDNA-Fragmente abtrennen zu können, wurde nachfolgend über mehrere Zyklen mit aus Lungengewebe isolierter mRNA hybridisiert (Subtraktion). Dabei bilden alle in beiden Zelltypen vorkommenden Transkripte cDNA-mRNA-Hybride, die mittels Hydroxylapatit-Chromatographie von einzelsträngiger cDNA abgetrennt werden können. Für diesen Vorgang wurde als Subtraktionsgewebe das hoch vaskularisierte Gewebe der Lungen favorisiert, da dieses in analytischen Hybridisierungsexperimenten die höchste Sequenzübereinstimmung zu Hirnkapillaren aufwies. Die auf diese Weise angereicherten einzelsträngigen cDNA-Fragmente wurden daraufhin in ein Vektorsystem eingebaut, mit dem anschließend *E. coli*-Zellen transformiert wurden. Die resultierenden rekombinanten Bakterienklone repräsentieren in ihrer Gesamtheit die subtraktive cDNA-Bank.

Mit Hilfe dieser BMEC-spezifischen cDNA-Bank konnte die Existenz des gehirnspezifischen Glucosetransporters GLUT-1 sowie des Apolipoproteins A1 in Hirnkapillarendothelzellen nachgewiesen werden (Weiler-Güttler et al., 1989, 1990). Daneben wurden aber auch cDNA-Fragmente von Glia-spezifischen Proteinen wie GFAP (glial fibrillary acid protein), MBP (Myelin basic protein) sowie PLP (Proteolipid protein) isoliert (Weiler-Güttler, 1993). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass während der Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank auch Transkripte angereichert wurden, die von zellulären Kontaminationen der BMEC-Präparation stammen.

Darüber hinaus wurden schließlich eine Reihe kurzer cDNA-Sequenzen isoliert, die keinerlei Sequenzähnlichkeiten zu bereits beschriebenen Nukleinsäuresequenzen aufwiesen (Zinke, 1992). Als besonders interessant erwies sich dabei der 400 bp lange cDNA-Klon seq12(83V), kurz Klon 83.5 genannt. Bei dieser cDNA-Sequenz handelt es sich um einen "expressed sequence tag" (EST), der ein cDNA-Fragment einer längeren mRNA-Sequenz darstellt. Durch vergleichende Analyse können diese ESTs zur Identifizierung neuer Gene in Genomsequenzen verwendet werden, wobei die Isolierung eines ESTs jedoch nicht notwendigerweise mit der Identifizierung eines proteinkodierenden Transkripts gleichzusetzen ist. Erst der Nachweis der Sequenz in der mRNA-Population eines Zelltyps bestätigt dessen natürliches Vorkommen und schließt eine artifizielle Bildung der Sequenz während der Herstellung der cDNA-Bank vollständig aus. Daher wurde im Fall des Klons 83.5 zuerst versucht, das vollständige Transkript aus einer konventionellen BMEC-cDNA-Bank zu isolieren. Hierbei konnte ein 2122 bp langer cDNA-Klon p83.5/22a (Abb. 3.3) isoliert werden (Martin, 1991),

dessen mRNA-Identität durch das vorhandene Polyadenylierungssignal sowie den PolyA-Schwanz am 3'-Ende bestätigt wurde. Auch mit dieser erweiterten cDNA-Sequenz konnten jedoch keine Ähnlichkeiten zu anderen Genen gefunden werden, die Aussagen über die Funktion des in der Transkriptsequenz kodierten Proteins ermöglicht hätten. Nachfolgend von Zinke, 1992 durchgeführte computerunterstützte Analysen der cDNA-Sequenz 83.5/22a favorisierten einen offenen Protein-Leserahmen, dessen Startcodon jedoch nicht in der vorhandenen Nukleinsäuresequenzinformation des Klons vorlag. Hydrophobizitäts- (Kyte and Doolittle, 1982) und Sekundärstruktur-Untersuchungen (Chou and Fasman, 1978) dieses hypothetischen Proteinfragmentes sowie Datenbankabgleiche mit der Peptidsequenz führten schließlich zu der Vermutung, dass das Transkript 83.5 möglicherweise für ein Transmembranprotein einer bisher noch nicht beschriebenen Rezeptorfamilie kodiert.

Da auch Proteinsequenzvergleiche, die durch die unterschiedliche Gewichtung von evolutionär bedingten Aminosäureaustauschen sensitiver sind als Sequenzvergleiche auf Nukleinsäure-Ebene (Bolger, 1995), keine detailliertere Charakterisierung ermöglichten, musste daher eine geeignete Strategie entwickelt werden, um ausgehend von der cDNA-Sequenz 83.5 die Isolierung und Charakterisierung des gesamten Gens sowie des dadurch kodierten Proteins zu ermöglichen. Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise ist hierbei aktueller denn je, da die immer schneller fortschreitende Entschlüsselung vollständiger Genome zwar eine immense Menge unbekannter Gensequenzen liefert, diesen jedoch im Normalfall keinerlei Genfunktionen zugewiesen werden kann (Jones, 2000).

Ausgehend von Nukleotidsequenzen, die keine Ähnlichkeiten zu bekannten Genen oder Transkripten aufweisen, muss zunächst die Gesamtlänge des untersuchten Transkripts aufgeklärt sowie dessen gewebespezifische Bildung untersucht werden. Der Vergleich von bereits vorhandener Sequenzinformation zu der tatsächlichen Länge des Transkripts gibt Auskunft darüber, wieviel an kodierender Sequenzinformation noch unbekannt ist und nachfolgend mittels geeigneter Verfahren charakterisiert werden muss. Die Identifizierung des transkriptbildenden Gewebes bzw. Zelltyps gibt Auskunft, ob die Genprodukte in allen Körperzellen gebildet werden und somit zur Klasse der Haushaltsproteine zählen, oder ob die Proteine nur an bestimmten Orten im Organismus gebildet werden und dort zellspezifische Aufgaben übernehmen.

Handelt es sich bei der untersuchten Sequenz um das vollständige Transkript, können durch computergestützte Sequenzanalysen möglich Proteine bestimmt werden. Da eine Aminosäure immer durch drei aufeinanderfolgende Nukleotide (Codon) repräsentiert wird, existieren für eine Nukleotidsequenz in Abhängigkeit des Startpunkts einer

hypothetischen Translation drei Leseraster (offene Leserahmen) für jeden Strang, die über Start- und Stoppcodons zu entsprechenden hypothetischen Proteinen führen. Wird durch die Computeranalyse wie bei Zinke, 1992 beschrieben eines dieser hypothetischen Proteine favorisiert, gabelt sich das weitere Vorgehen in zwei Forschungsrichtungen auf. Einerseits kann die Aufklärung der Genstruktur auf chromosomaler Ebene erfolgen. Dazu gehört die Charakterisierung des Strukturgens sowie seiner regulatorischen Promotorregion, die für eine gewebespezifische Genexpression ausschlaggebend ist. Zum Anderen ist es notwendig, das native Protein aus Gewebe oder Zellen zu isolieren. Dies wird durch die Verfügbarkeit proteinspezifischer Antikörper möglich, die sowohl die Isolierung des Proteins als auch dessen Lokalisation im Gewebeschnitt ermöglichen. Das so gewonnene Protein kann schließlich auf Modifikationen wie Glykosylierungs- und Phosphorylierungsmuster sowie auf die Wechselwirkung mit anderen Molekülen hin untersucht werden, um damit die Funktion des Proteins im jeweiligen Zelltyp sowie im übergeordneten Gewebe aufzuklären.

Dem oben vorgestellten Ansatz folgend wurden von Schepelmann, 1996 zuerst RT-PCR- und Northern Blot-Analysen durchgeführt, um eindeutige Aussagen über den das Transkript 83.5 bildenden Gewebetyp treffen zu können. Diese Experimente wiesen darauf hin, dass es sich um ein gehirnspezifisches Transkript handelt. Bei dem darauffolgenden Versuch, die vollständige cDNA-Sequenz des Transkripts 83.5 aus einer Gesamthirn-cDNA-Bank zu isolieren, wurde ein weiterer cDNA-Klon isoliert, der sich im 5'-Bereich vollständig vom Ersten unterschied. Die Vervollständigung dieses zweiten Transkripts mittels 5'-RACE-PCR ergab eine 2674 nt lange mRNA-Sequenz, die ausgehend von einem Translationsstartcodon an Pos. 588 für ein 142 AS langes, hypothetisches Protein kodiert. Hydrophobizitäts- sowie Sekundärstrukturanalysen der Aminosäuresequenz ließen die Vermutung zu, dass das hypothetische Protein eine 25 AS-lange, α -helicale Transmembrandomäne besitzt. Aus diesem Grund wird dieses Transkript in der vorliegenden Arbeit im weiteren tmp 83.5 (*transmembrane proteins*) sowie das daraus resultierende Protein zur besseren Unterscheidung TMP 83.5 genannt. Nach den Ergebnissen der bisher durchgeführten Arbeiten scheint es sich bei TMP 83.5 um ein noch nicht charakterisiertes Transmembranprotein zu handeln, das entweder zu einer bisher nicht beschriebenen Rezeptorproteinklasse gehört oder als Untereinheit größerer Proteinkomplexe in der Zellmembranen von Säugetiergehirn vorkommt.

Die Vervollständigung des zuerst isolierten Transkripts mittels 5'-RACE-PCR (Schepelmann, 1996; Bangsow, 1997) und Transkriptionsstartpunktsbestimmung (Perl, persönliche Mitteilung) ergab eine 2374 nt lange mRNA-Sequenz, die möglicherweise für ein 46 AS langes Protein kodiert. Dieses Protein ist vollkommen identisch mit dem

cytoplasmatischen C-Terminus von TMP 83.5 (Bangsow et al., 1998), daher wird es im Folgenden als SP 83.5 (soluble proteine) und sein Transkript als sp 83.5 bezeichnet. Es scheint sich hierbei um die lösliche Isoform des Membranproteins TMP 83.5 zu handeln, wobei auch in diesem Fall eine funktionelle Einordnung durch Ähnlichkeiten mit in der Literatur beschriebenen Proteinen nicht möglich ist.

Parallel zu den Arbeiten von Schepelmann klärte Bangsow, 1997 die vollständige Struktur des zugehörigen Gens auf und postulierte einen Bildungsmechanismus für beide Transkripte, wobei jedes Transkript unter der Kontrolle einer eigenen Promotorregion steht. Abbildung 2.10 illustriert die Bildung der Transkripte tmp und sp 83.5 ausgehend von der chromosomalen Gen-Sequenz 83.5.

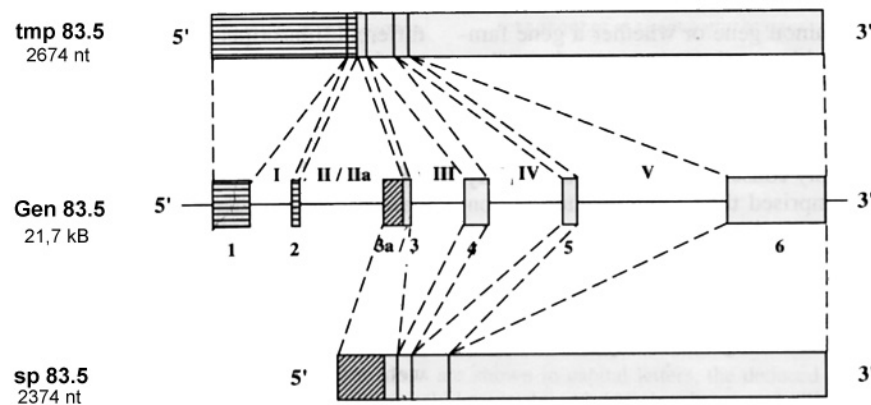


Abb. 2.10 Bildung der Transkripte tmp sowie sp aus dem Gen 83.5 nach Bangsow et al., 1998. Das Gen 83.5 besteht aus 6 Exon- (römische Ziffern) und 5 Intronbereichen (lateinische Ziffern). Von dieser Genstruktur ausgehend wird das Transkript tmp 83.5 aus 6 Exons sowie das Transkript sp 83.5 aus 4 Exons gebildet. Die Bildung des Letzteren wird von einem alternativen Promotor im Intronbereich II gesteuert. Daraus ergibt sich ein individuell verlängertes Exon 3a des Transkripts sp 83.5, dem die Exons 1 und 2 vollständig fehlen.

Um zu klären, ob es sich bei den von Bangsow und Schepelmann charakterisierten Transkripten tatsächlich um für funktionale Proteine kodierende mRNA-Sequenzen handelt, muss nun die Existenz dieser Proteine im Schweinegehirn nachgewiesen und diese anschließend isoliert werden.

Isolierung und Charakterisierung der nativen Proteine aus tierischem Gewebe stellt somit den letzten Abschnitt des hier beschriebenen Ansatzes dar, bisher unbekannte Proteine über ihre Transkriptsequenz zu identifizieren und zu isolieren. Sowohl für Proteinnachweis als auch –isolierung wird dabei zunächst ein effizientes Reinigungssystem aus Gewebe oder Zellen benötigt, das die Isolierung einer für

weiterführende Funktionsanalysen ausreichenden Proteinmengen ermöglicht. Da bisher immer noch keine Aussagen über die Funktion der hypothetischen Proteine gemacht werden können, ist eine Proteinisolierung bezüglich funktioneller Eigenschaften ausgeschlossen und nur mittels Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung von spezifischen Antikörpern möglich. Diese lassen sich z. B. mittels Immunisierung eines evolutionär weiter entfernten Tierorganismus erhalten, wobei methodisch zwei Wege bestritten werden können. Entweder wird das zur Immunisierung benötigte Proteinfragment in *E. coli* produziert, oder man verwendet synthetisch hergestellte, kurzkettige Peptide, wobei im letzteren Fall die Möglichkeit besteht, Antikörper gegen genau definierte Proteinbereiche herzustellen.

Eine erfolgreiche Isolierung stellt die Grundlage für weitere Charakterisierungen der beiden Proteine dar, die nun auf Modifikationen wie Phosphorylierungs- und Glykosylierungsmuster untersucht werden könnten. Diese Ergebnisse sowie darauf aufbauende Untersuchungen, wie z. B. bezüglich möglicher Wechselwirkungen mit anderen Molekülen oder der Kontrollelemente, die für eine gewebespezifische Bildung verantwortlich sind, sollten schließlich helfen, die Funktion dieser neuen Transmembranproteinklasse sowie deren löslicher Isoform im Säugetiergehirn aufzuklären.

2.4 Aufgabenstellung

Bei dem Versuch Blut-Hirn-Schranke-spezifische Proteine zu identifizieren, wurden in unserer Arbeitsgruppe zwei ausschließlich im Hirngewebe transkribierte mRNA-Sequenzen (tmp und sp 83.5) isoliert. Die beiden Transkripte kodieren möglicherweise für eine bisher noch nicht beschriebene Rezeptorproteinklasse und deren lösliche intrazelluläre Isoform.

Um zu klären, ob es sich bei den bisher nur hypothetisch postulierten Proteinen TMP und SP 83.5 tatsächlich um funktionale Proteine des Säugetiergehirns handelt, sollte mit Hilfe peptidspezifischer Antikörper zuerst deren Existenz im Schweinegehirn nachgewiesen und anschließend ein effizientes Reinigungssystem als Basis für eine nachfolgende funktionelle Proteinanalyse entwickelt werden. Desweiteren sollten Untersuchungen zum zellulären Vorkommen der Transkripte sowie computergestützte AS-Sequenzanalysen durchgeführt werden, um somit erste Hinweise über die mögliche Struktur und Funktion beider Proteine im Säugetiergehirn zu erlangen.

Daraus ergaben sich folgende Aufgabenstellungen:

- Identifizierung von zur Immunisierung geeigneten Peptidsequenzen sowie die Charakterisierung der resultierenden Immunsereen bezüglich ihrer Peptidspezifität.
- Nachweis der von den beiden mRNA-Sequenzen kodierten Proteine mittels Western Blot-Analysen von Schweinegehirnaufschlüssen unter Verwendung der peptidspezifischen Immunsereen.
- Herstellung von Immunaффinitäts-Chromatographiesäulen unter Verwendung von aus den Rohsereen isolierten peptidspezifischen Antikörpern, die zur Etablierung eines effizienten Reinigungssystems eingesetzt werden sollten.
- Ermittlung des zellulären Bildungsortes im Schweinegehirn durch *in situ*-Hybridisierungen. Hierzu sollten geeignete cRNA-Sonden hergestellt und optimale Bedingungen für die Hybridisierung von Hirnschnitten erarbeitet werden.
- Computergestützte Sequenzanalysen sollten erste Einblicke über Struktur und Funktion der beiden Proteine im Schweinegehirn verschaffen.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva
40 %ige Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (19:1)	Applichem
Agarose	Sigma
Amberlite MB-1	Serva
Ammoniumacetat	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Fluka
Ammoniumsulfat	Fluka
Ampicillin	Aldrich
2.2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6))	Sigma
Borsäure	Fluka
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid	GERBU
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat Toluidinsalz	Applichem
Bromphenolblau	Fluka
Casein	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
CSPD	Roche
Diethylpyrocarbonat	Janssen Chimica
N,N-Dimethylformamid	Roth
Dithiothreitol	Biomol
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	Merck
Ficoll-400	Serva
Formalin-Lösung (37 %)	Roth
Glucose	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Biomol
Guanidiniumhydrochlorid	Roth
Guanidiniumthiocyanat	Roth
Harnstoff	Biomol
Hefeextrakt	Oxoid
Igepal CA-630	Sigma
Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid	Roth
β -Mercaptoethanol	Fluka
N,N'-Methylenbisacrylamid	Roth
Methylenblau	Fluka
3-(N-Morpholino)-propansäure	AppliChem

Natriumazid	Merck
tri-Natriumcitrat	Roth
Natriumcyanoborhydrid	Pierce
Natriumdodecylsulfat	Serva
Natrium-lauroyl-sarkosin	Sigma
Natriumperiodat	Lancaster
Natriumthiosulfat	Fluka
Nonidet P40	Fluka
Phenol	Roth
Polyethylenglycol	Pharmacia
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Ponceau S	Sigma
Saccharose	Roth
Silberchlorid	Biomol
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Serva
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Biomol
Triton X-100	Fluka
Xylenecyanol	Fluka

3.2 Enzyme und Proteine

DNase, RNase-frei	Roche
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Merck
Restriktionsendonukleasen	Gibco BRL
Rinderserumalbumin	Applichem
RNase A	Roche
SuperScript II Reverse Transkriptase	Gibco
T4-DNA-Ligase	Promega
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia
T7-RNA-Polymerase	Roche
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL

3.3 Immunglobuline

Gesamtserum aus Ziege	Jackson
Kaninchen Anti-GFAP-IgG	Sigma
Maus Anti-GFAP-IgG, monoklonaler Klon G-A-5	Sigma
Schaf Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment-aP	Roche

Ziege Anti-Kaninchen-H&L-IgG-Texas Red	Vector
Ziege Anti-Kaninchen-IgG-FICT	Sigma
Ziege Anti-Kaninchen-H&L-IgG	Rockland
Ziege Anti-Kaninchen-IgG-aP	Sigma
Ziege Anti-Kaninchen-IgG-POD	Sigma

3.4 Inhibitoren

Proteinase-Inhibitoren

L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido-(4-guanidino)-butan	Sigma
Leupeptin	Bachem
Pepstatin	Bachem
Pefabloc [®] SC	Roche, Roth

RNase-Inhibitor

RNasin	Promega
--------	---------

3.5 Nukleotide, Oligonukleotide, DNA und RNA

Desoxynukleotide	Roth
Heringssperma-DNA	Roche
tRNA aus Hefe	Sigma

Radionuklide

[α - ³⁵ S-dATP]	(3000 Ci/mM)	DuPont NEN
------------------------------------	--------------	------------

Oligonukleotide

Universalprimer:

SPT 3 5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA 3'

SPT 7 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer

Gensequenz 83.5 spezifische Primer:

SC1 5' AAG ACG GTA TCA GGC AG 3'

SC8 5' CAC TTT ATC AGA TCA GTC 3'

PE03 5' GAG ACA GTC TGT GCA AGG TTA GGG TAT GGT 3'

PE03a PE 03 an Position 1 mit alkalischer Phosphatase konjugiert

3.6 Chromatographiematerial

AminoLink [®] Plus Kopplungs-Gel	Pierce
CarboLink [™] Kopplungs-Gel	Pierce
Nap5 Säulen	Pharmacia
PD10 Säulen	Pharmacia
Protein A-Agarose	Roche
Qiagen [®] -tip 100 Säulen	Qiagen
Qiaquick PCR-Reinigungssäulen	Qiagen

3.7 Spezielle Materialien

BCA-Lösung	Pierce
Blocking-Lösung	Roche
Bradford-Lösung Roti [®] -Quant	Roth
DIG Quantifizierungs-Teststreifen	Roche
DIG RNA Markierungssystem	Roche
pGemT Klonierungs-System	Promega
QuickPrep [™] Micro mRNA Isolierungssystem	Pharmacia
Silikonstift Pap Pen	Fisher Scientific
SuperFrost Objektträger	Menzel
T7 Sequenzier-System	Pharmacia
Tissue Tek Kryoprotektionsmedium	Electron Microscopy Sciences
Vectorshield Einbettmedium	Vector

3.8 Verwendete Membranen und Filter

Centricons, YM 100, 30, 10, 3	Amicon
Dialyseschlauch Spectra/Por Ausschlussgröße 3.5 kDa	Roth
Dialyseschlauch, Ausschlussgröße 12-14 kDa	Visking
Hybond Nylon-Membran	Amersham
Nitrozellulose, Ø 0.2 µm	Schleicher und Schüll
Polyvinylidendifluorid-Membran, Ø 0.2 µm	BioRad
Slide-A-Lyzer [®] Dialyse Kassette	Pierce
Ultrafiltrationsmembranen Omega 30, 3, 1 kDa	Pall Gelman
Ultrafiltrationsmembranen RC 30, 5 kDa	Sartorius
Whatman 3MM-Filterpapier	Whatman

3.9 Geräte und sonstige Materialien

Bioblock Scientific Heizblock	Thermolyne Corp.
Digitalkamera Orka 100	Hamamatsu
DNA-Sequenzierapparatur Makrophor	LKB
Druckfiltrationsrührzellen, 50 und 300 ml	Amicon/Milipore
Elektrophoreseapparaturen	TU Darmstadt, LKB
ELISA-Reader	SLT-Labinstruments
Entwicklungskemikalien für die Autoradiographie	DuPont
Expositionsbox für die Autoradiographie	Kodak
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskope	Nikon und Zeiss
Glashomogenisator, 30, 15, 5 ml mit Glas oder Teflonpistill	Dounce
Kryomikrotom HM 500 OM	MICROM
Mikro-Quarzküvetten, 104/2B-QS	Hellma
PCR-Thermocycler	MWG Biotech
Polaroidfilme Typ 607	Polaroid
Röntgenfilme Kodak Xomat AR-5	Siemens
Spannungsgeräte	LKB
Speed-Vac-Concentrator UVC 150 H	Univapo
Spektralphotometer DU 70	Beckmann
Tischzentrifuge	Hettich
Trans Blot SD Western Blotapparatur	Bio-Rad
Ultra Turrax-Homogenisator, T45/N und TP 18/10	Janke und Kunkel
Ultrazentrifuge (L8-55 M/ LE-80 K), L5	Beckmann
Ultrazentrifugen-Rotoren SW 28, SW 41, Ti60	Beckmann
Zentrifugen RC2B, RC5C	Sorvall
Zentrifugen-Rotoren GSA, SS-34	Sorvall

3.10 Bakterien

Escherichia coli DH5 α (Woodcock et al., 1989)

Genotyp: supE44 Δ lac U169 (Φ 80 lacZ Δ M15) hsdR 17 rec A1 end A1 gyrA 96 – 1 rel A1

3.11 Plasmide

3.11.1 Plasmid pGem-T, Promega

Das high-copy Plasmid pGem-T wurde für die Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Es liegt in linearer Form vor und zeichnet sich durch 3'-überhängende Thymidinreste an seiner geöffneten Polylinkerregion (MCS) aus. Die MCS wird von T7- und SP6-RNA-Polymerase Promotoren flankiert, was die *in vitro*-Transkription der inserierten DNA ermöglicht.

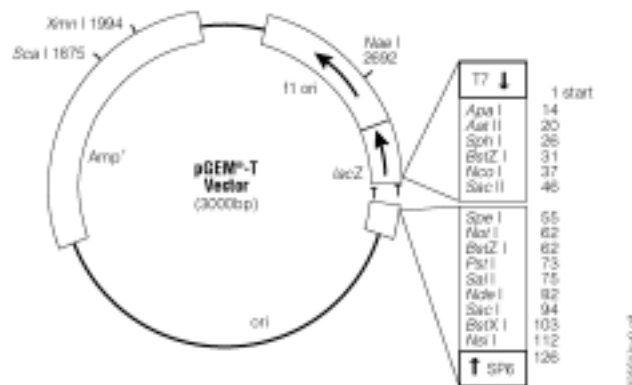


Abb. 3.1 Schematische Abbildung des Vektors pGem-T.

Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen; ori: Replikationsursprung; lacZ: kodiert für das α -Peptid des Enzyms β -Galactosidase; f1 ori: Replikationsursprung des Bakteriophagen f1; T7, SP6: Promotor für T7- und SP6-abhängige Bakteriophagen-RNA Polymerase.

3.11.2 Zur *in vitro*-Transkription verwendete rekombinante Plasmide

Die hier dargestellten rekombinanten Plasmide wurden zur *in vitro*-Transkription von 83.5-spezifischer cRNA benutzt, die als Hybridisierungs sonden für *in situ*-Hybridisierungsexperimente eingesetzt wurden.

Die 3287 bp großen Plasmide pFF1 und pFF2 bestehen aus dem Vektor pGem-T, in den über die überstehenden Thymidinreste das mittels PCR amplifizierte cDNA-Fragment SC1/SC8 (284 bp) eingefügt wurde. Das cDNA-Fragment entspricht Position 906 bis Position 1190 der cDNA-Sequenz des Transkripts tmp 83.5. Beide Plasmide unterscheiden sich nur bezüglich der Orientierung des inserierten Fragments zur T7-RNA-Polymerase Promotorsequenz. Dadurch ist es möglich, mit einer RNA-Polymerase sowohl antisense- als auch sense-Sonden zu synthetisieren.

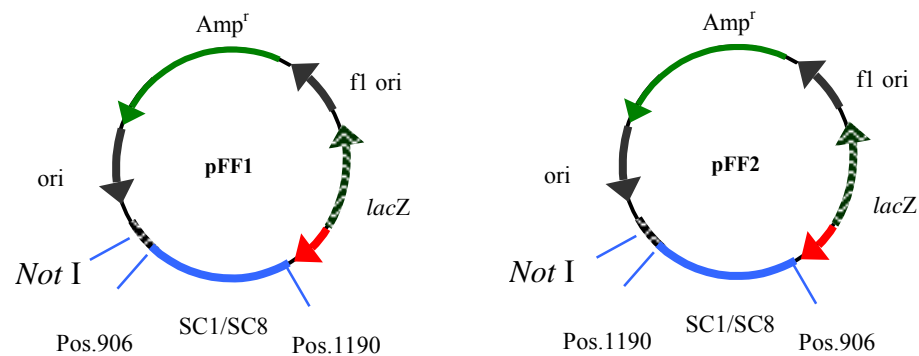


Abb. 3.2 Schematische Darstellung der Plasmide pFF1 und pFF2.

Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen; ori: Replikationsursprung; Not I: Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease Not I; SC1/SC8: cDNA-Fragment des Transkripts tmp 83.5; T7: Promotor für T7-abhängige Bakteriophagen-RNA Polymerase; lacZ: kodiert für das α -Peptid des Enzyms β -Galactosidase; fl ori: Replikationsursprung des Bakteriophagen f1.

Zur Herstellung alternativer 83.5-spezifischer cRNA-Sonden wurden die Plasmide p83.5/22a (Martin, 1991) sowie pG2/1 (Schepelmann, 1996) verwendet, die bereits als Dauerkulturen vorlagen. Die zur *in vitro*-Transkription notwendigen Mengen an Plasmid-DNA wurde gemäß (4A.5.2) aus den Dauerkulturen präpariert.

Das Plasmid p83.5/22a besteht aus dem Vektor pBluescript SK(-), in den über Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* ein 2122 bp langes, 83.5-spezifisches cDNA-Fragment eingefügt wurde (Martin, 1991). Die letzten 2028 bp entsprechen dem identischen 3'-Bereich der beiden Transkriptformen tmp und sp 83.5, während die restliche Sequenz 94 bp der individuellen sp 83.5-Sequenz darstellt. Die Insertion wurde derart ausgerichtet, daß ihr 3'-Terminus in der Nähe der *XhoI*-Erkennungssequenz lokalisiert ist. Somit ist es möglich, ausgehend vom T7-Promotor eine 83.5-spezifische antisense cRNA-Sonde zu generieren.

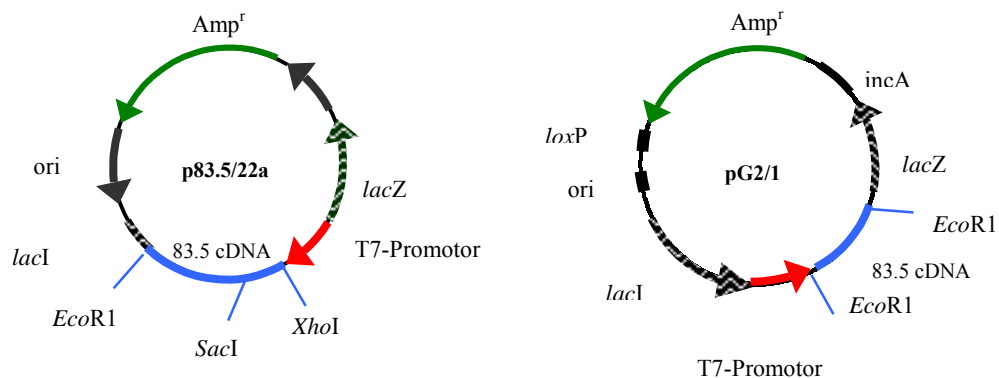


Abb. 3.3 Schematische Darstellung der Plasmide p83.5/22a und pG2/1.

Abkürzungen: siehe Abb. 1.1, 1.2 und Text. incA: Inkompatibilitätslocus.

Das Plasmid pG2/1 wurde von Schepelmann, 1996 aus einer Schweinegehirn-cDNA-Bank isoliert. Es setzt sich aus dem Vektor pZL1 und der über *EcoRI*-Schnittstellen inserierten 83.5-spezifischen cDNA zusammen. Die 2160 bp lange Insertion ist derart ausgerichtet, dass ausgehend vom T7-Promotor eine 83.5-spezifische sense cRNA-Sonde hergestellt werden kann.

3.12 Sequenzdatenbanken

EMBL	European Molecular Biology Laboratory Data Library Nucleotid Sequence Database, Heidelberg
GenBank	GenBank, IntelliGenetics INC., View, USA
PDB	Brookhaven Protein Data Bank, Cambridge, USA
PIR	Protein Identification Resource National Biomedical Research Foundation, Washington, USA
PROSITE	Department de Biochimie Medicale Centre Medical Universitaire, Genf, Schweiz
SBASE	SBASE Library of Protein Domain Sequences, Triest, Italien
SWISS-Prot	Department de Biochimie Medicale, Centre Medical Universitaire, Genf, Schweiz

3.13 Größenstandards

Zur Molmassenbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen wurde bei der Agarose- bzw. Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein Größenstandard bekannter Molmasse mit aufgetrennt. Aus der Eichgeraden der Molmassen dieser Nukleinsäuren bzw. Standardproteine gegen ihre R_f -Werte kann die Molmasse unbekannter Nukleinsäuren bzw. Proteine anhand der ermittelten R_f -Werte bestimmt werden.

Nukleinsäure-Größenstandards

Zur Längenabschätzung gelelektrophoretisch getrennter DNA-Moleküle wurden zwei unterschiedliche Längenstandards verwendet. Der mit *Hae* III hydrolysierte pUC 18-Plasmidstandard wurde gemäß (4A.11.1) selbst hergestellt. Bei dem von Roche bezogenen MWM III-Standard handelt es sich um mit *Eco*R1 und *Hind* III hydrolysierte λ -Phagen DNA.

Tab. 3.1 Fragmentgrößen der verwendeten Nukleinsäurestandards.

PUC 18/HAE III [bp]	MWM III, Roche [bp]
	21226
	5148
	4973
	4268
	3530
	2027
	1904
	1584
	1375
	947
	831
587	
	564
458	
434	
267	
257	
174	
	125
102	
80	

Der verwendete RNA-Größenstandard stellt eine Mischung von sechs cRNA-Populationen mit synthetisch angehängtem poly(A) Schwanz dar.

Tab. 3.2 Fragmentgrößen des RNA-Standards

0.24-9.5 kb RNA Leiter, Gibco [kb]
9.49
7.46
4.40
2.37
1.35
0.24

Protein-Größenstandards

Zur Größenabschätzung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine wurde parallel zu den zu untersuchenden Protein-Lösungen folgende Protein-Eichlösung mit aufgetrennt.

Tab. 3.3 Low Molecular Weight (LMW) Marker von Gibco.

Protein	Größe (kDa)
Ovalbumin	43
Carbo-Anhydrase, Rind	29
β -Lactoglobulin	18.4
Lysozym	14.3
Trypsin-Inhibitor, Rind	6.2
Insulin β -Kette	3.4
Insulin α -Kette	2.3

Tab. 3.4 SDS-7-Marker, Sigma.

Protein	Größe (kDa)
Albumin, Rind	66
Albumin, Ei	45
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	36
Carbo-Anhydrase, Rind	29
Trypsinogen, Pankreas	24
Trypsin-Inhibitor, Sojabohne	20
A – Lactalbumin	14.2

Tab. 3.5 Farbstoffmarkierter Proteinstandard Benchmark Protein Ladder, Gibco.

Protein-Bande	Größe (kDa)
1	184
2	116
3	84
4	62*
5	51
6	38
7	25
8	20
9	14
10	9

*Diese Proteinbande ist zur besseren Zuordnung des Bandenmusters mit einem rosa Farbstoff gekoppelt.

3.14 Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen

LB-Medium:	10	g/l	NaCl
	10	g/l	Casein
	5	g/l	Hefeextrakt

SOB-Medium:	2	% (w/v)	Casein
	0.5	% (w/v)	Hefeextrakt
	10	mM	NaCl
	2.5	mM	KCl
	10	mM	MgCl ₂
	10	mM	MgSO ₄

SOC-Medium besteht aus autoklaviertem SOB-Medium, das auf 20 mM Glucose eingestellt wurde.

TE-Puffer:	10	mM	Tris-HCl, pH 7.8
	1	mM	EDTA, pH 8.0

20 x SSC-Puffer:	3	M	NaCl
	0.3	M	tri-Natriumcitrat

50 x TAE-Puffer:	2	M	Tris-Base
	1	M	Eisessig
	50	mM	EDTA, pH 8.0

10 x PBS-Lösung:	1.4	M	Natriumchlorid
	27	mM	Kaliumchlorid
	100	mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	2	mM	Kaliumdihydrogenphosphat

10 x TBST-Lösung:	1.5	M	Natriumchlorid
	100	mM	Tris-HCl, pH 8.0
	0.5	%	Tween 20

Dig I-Puffer:	100	mM	Tris-HCl, pH 7.4
	100	mM	NaCl

Dig II-Puffer:	100	mM	Tris-HCl, pH 9.5
	100	mM	NaCl
	50	mM	MgCl ₂

aP-Puffer:	100	mM	Tris-HCl, pH 9.5
	100	mM	Natriumchlorid
	5	mM	Magnesiumchlorid
Stopp-Puffer:	20	mM	Tris-HCl, pH 8.0
	5	mM	EDTA, pH 8.0

Natriumphosphat-Pufferlösungen unterschiedlichen pH-Werts wurden aus 1 molaren Stammlösungen von Dinatriumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat gemäß der Henderson-Hasselbalch-Gleichung nach folgendem Schema hergestellt:

pH-Wert	V (1 M Na ₂ HPO ₄) [ml]	V (1 M NaH ₂ PO ₄) [ml]
7.0	57.7	42.3
7.2	68.4	31.6
7.4	77.4	22.6

Die Lösung wurde anschließend auf ein Gesamtvolumen von 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

4 %ige Paraformaldehyd-Lösung wurde jeweils frisch zur Fixierung von Gewebeschnitten hergestellt. Hierfür wurden 4 g Paraformaldehyd in 30 ml dest. H₂O, das mit DEPC behandelt worden ist, bei 70 °C gelöst. Nach der Zugabe von einigen Tropfen 1 N Natronlauge klärte sich die Lösung spontan auf. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung auf 100 ml Gesamtvolumen und 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.5 eingestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung 40 g (NH₄)₂SO₄, p.a. wurden unter Wärmezufuhr in 50 ml H₂O_{bidest} gelöst. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 175 µl Ammoniak-Lösung supplementiert.

TE-Puffer gesättigtes Phenol 4 g kristallines Phenol wurden in 1 ml TE-Puffer bei 65 °C gelöst und durch Extraktion mit 1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.8 auf einen pH-Wert von 6.5 eingestellt.

100 x Denhardt's:	2	% (w/v)	BSA
	2	% (w/v)	Ficoll-400
	2	% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon

4 Methoden

4A Molekularbiologische Methoden

4A.1 Sterilisation von Lösungen, Medien und Geräten

Hitzestabile Lösungen und Medien sowie Materialien aus Kunststoff wurden 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert, während Glasgeräte, wie z. B. Glaspipetten und Erlenmeyerkolben, durch mehrstündige Trockensterilisation bei 180 °C entkeimt wurden. Hitzelabile Lösungen, z. B. Antibiotika-Lösungen, wurden sterilfiltriert.

4A.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien nach Maniatis et al. (1989)

Die Anzucht von Bakterien erfolgte im Allgemeinen in LB-Medium bei 37 °C über Nacht. Bei Ampicillin-resistenten Bakterienstämmen wurde das Medium zusätzlich auf eine Konzentration von 100 µg/ml Ampicillin eingestellt. Zur Anzucht einzelner Bakterienkolonien und zur Herstellung von Vereinzelausstrichen wurden Plattenkulturen aus festen Nährböden verwendet, die durch Zusatz von 15 g/l Agar aus LB-Medium hergestellt wurden. Die Plattenkulturen wurden invertiert bebrütet; die darauf angezogenen Bakterien können bei 4 °C mehrere Monate aufbewahrt werden. Zur Herstellung von *E. coli* Vor- und Dauerkulturen, sowie für die analytische Plasmidisolierung wurden 5 ml LB-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie einer Plattenkultur inokuliert und über Nacht geschüttelt. Für die präparative Isolierung von Plasmid-DNA wurden 150 ml LB/Ampicillin-Medium in einem 500 ml Schikanekolben mit 1 ml Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 150-200 rpm kultiviert. Zur längeren Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden 1.6 ml Flüssigkultur mit 400 µl Glycerin in Kryo-Röhrchen vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

4A.3 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* DH5α-Zellen (Hanahan, 1983)

Die Herstellung von *E. coli* DH5α-Zellen, die für die Aufnahme von Plasmid-DNA geeignet sind, wurde nach der Vorschrift von Hanahan, 1983 durchgeführt. Hierfür wurde ein frischer Einzelausstrich von *E. coli* DH5α auf einer SOB-Kulturplatte hergestellt. Einige der Bakterienkolonien wurden in 1 ml SOB-Flüssigmedium resuspendiert und damit anschließend 50 ml SOB-Medium in einem 1 l Schikanekolben beimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer OD_{556nm} von 0.44-0.55 unter Schütteln bei 37 °C kultiviert. Nach dem Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurde die

Bakterienkultur 10 min in Eis abgekühlt und weitere 10 min bei 2 500 rpm in einem SS-34 Rotor zentrifugiert. Das Sediment wurde in 14 ml eisgekühltem FSB-Puffer resuspendiert und 15 min in Eis gekühlt. Nach erneuter Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen wurde das Sediment in 3.4 ml FSB-Puffer resuspendiert und in Eis gekühlt. Nach 5 min wurde zu der Suspension 120 µl Dimethylsulfoxid pipettiert und sofort gemischt. Dieser Vorgang wurde nach 5 min Eiskühlung wiederholt und daraufhin die Bakteriensuspension zu je 210 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert. Nach mindestens 2 Tagen Lagerung wurde die Transformationskompetenz der Zellen überprüft. Diese lag durchschnittlich bei 10^8 - 10^9 koloniebildenden Einheiten pro eingesetztes Mikrogramm Plasmid-DNA.

FSB-Puffer:	100	mM	KCl
	45	mM	MnCl ₂
	10	mM	CaCl ₂
	3	mM	Hexamincobalttrichlorid
	10	mM	KOAc, pH 7.5
	10	% (w/v)	Glycerin

4A.4 Transformation kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen

Die Transformation der rekombinanten Plasmide erfolgte in *E. coli* DH5α kompetenten Zellen, die zur Selektion der positiv rekombinanten Transformanten einen Blau/Weiß-Test gestatten. Die aufgetauten Zellen wurden invertiert und jeweils 200 µl in gekühlte 12 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 20 µl des Ligationsansatzes wurde 30 min in Eis gekühlt. Daraufhin wurde genau 45 sec auf 42°C erwärmt und anschließend erneut 2 min in Eis gekühlt. Danach wurden 450 µl des auf 42°C temperierten SOC-Mediums zugegeben und 1 h bei 37°C unter Schütteln (225-250 rpm) inkubiert. Die Transformanten wurden daraufhin in einer Verdünnung von 50 µl, 100 µl, 150 µl und 200 µl mit einem sterilen Trigalsky-Spatel auf LB-Ampicillin Agar-Platten ausplattiert. Zur Blau/Weiß-Selektion der rekombinanten Transformanten wurden jeder Verdünnung vor dem Ausplattieren 20 µl 0.2 M IPTG-Lösung und 20 µl 10 %ige X-Gal-Lösung zupipettiert und die ausplattierten Bakterien über Nacht bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA der rekombinanten, weißen Transformanten nach (4A.5.1) zur weiteren Analyse isoliert.

4A.5 Präparation von Plasmid-Dann

4A.5.1 Analytische Plasmidpräparation nach Crouse et al. (1983)

Von einer nach (4A.2) hergestellten 5 ml LB-Übernachtskultur wurden 1.5 ml steril in ein Eppendorfgefäß überführt und 30 sec in einer Hettich-Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Bakteriensediment in 200 µl kaltem STET-Puffer resuspendiert und anschließend mit 16 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) versetzt wurde. Daraufhin wurde die Lösung zwei- bis dreimal invertiert und 90 sec auf 100 °C erhitzt. Dabei ist auf die korrekte Einhaltung der Lysezeit sowie auf eine geringe mechanische Beanspruchung zu achten, da sich ansonsten der nicht erwünschte Anteil chromosomaler DNA in der Lösung erhöht. Zur Abtrennung der freigesetzten Plasmide von den bakteriellen Membranfragmenten wurde 10 min in einer Tischzentrifuge sedimentiert und das Zell-Sediment mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 200 µl 2-Propanol 30 min bei –20 °C gefällt (4A.9.3). Nach 15 min Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Sediment mit 500 µl kaltem 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das für 5 min an der Luft getrocknete DNA-Sediment in 50 µl TE-Puffer, der auf eine RNase A-Konzentration von 100 µg/ml eingestellt wurde, gelöst und danach 15 min auf 65 °C erwärmt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei –20 °C gelagert.

STET-Puffer:	8	% (w/v)	Saccharose
	5	% (w/v)	Triton X-100
	50	mM	EDTA, pH 8.0
	50	mM	Tris-HCl, pH 8.0

4A.5.2 Präparation von Plasmid-DNA mittels QIAGEN®-Säulen

200 ml einer nach (4A.2) hergestellten Bakteriensuspension wurden 10 min bei 4 000 rpm in einem GSA-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakteriensediment in 4 ml P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml P2 wurde das Zentrifugenröhrchen vorsichtig 4-6 mal invertiert und danach die Lösung genau 5 min bei RT gelagert. Anschließend wurde die viskose Lösung mit 4 ml gekühltem P3 neutralisiert und 20 min in Eis gekühlt. Zur Sedimentation der Zell-Trümmer wurde 30 min bei 13 000 rpm und 4 °C in einem HB-4 Rotor zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierten Qiagen®-Säule aufgetragen und diese daraufhin zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Die Elution der Plasmide erfolgte mit 5 ml QF-Puffer in sterile Greiner-Röhrchen. Zur Präzipitation der isolierten Plasmid-DNA wurde die Lösung mit dem 0.7 fachen Volumen an

2-Propanol versetzt und 5 min in Eis gekühlt. Daraufhin wurde die Plasmid-DNA 30 min bei 13 000 rpm und 4 °C im HB-4 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen, das Sediment zweimal mit 5 ml 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und jeweils zwischen den Waschschritten 5 min zentrifugiert wurde. Das vom Ethanol befreite, getrocknete DNA-Sediment wurde in Abhängigkeit von seiner Größe entweder in 50 oder 100 µl sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei –20 °C gelagert.

Resuspensions-Puffer P1:	50	mM	Tris-HCl, pH 8.0
	10	mM	EDTA,
	100	µg/ml	RNase A
Lyse-Puffer P2:	200	mM	NaOH
	1	% (w/v)	SDS
Neutralisierungs-Puffer P3:	3	M	KOAc, pH 5.5
Äquilibrierungs-Puffer QBT:	50	mM	MOPS, pH 7.0
	750	mM	NaCl
	15	% (v/v)	Ethanol
	0.15	% (w/v)	Triton X-100
Wasch-Puffer QC:	50	mM	MOPS, pH 7.0
	1	mM	NaCl
	15	% (v/v)	Ethanol
Elutions-Puffer QF:	50	mM	Tris-HCl, pH 8.5
	1.25	M	NaCl
	15	% (v/v)	Ethanol

4A.6 Isolierung von RNA aus Gewebe

Um Kontaminationen mit RNasen zu verhindern, mussten beim Umgang mit Ribonukleinsäuren besondere Vorkehrungen getroffen werden (Maniatis et al., 1989). Prinzipiell wurde mit sterilen Gefäßen und Gegenständen gearbeitet, die mindestens 4 h bei 160 °C gelagert wurden. Alle wäßrigen Lösungen, die mit RNA-haltigen Lösungen in Kontakt kamen, wurden zuvor mit 0.05 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und über Nacht unter Rühren inkubiert. DEPC, das RNasen durch die Ethylierung des aktiven Zentrums inaktiviert, ist stark cancerogen und muss durch mindestens zweimaliges Autoklavieren aus den Lösungen entfernt werden. Hitzelabile sowie aminhaltige Lösungen wurden ausgehend von nukleasefreien Chemikalien mit DEPC-

behandeltem Wasser hergestellt. Elektrophoreseapparaturen sowie Quarzküvetten zur Bestimmung von RNA-Konzentrationen wurden vor dem Gebrauch in 3 %ige (v/v) Wasserstoffperoxid-Lösung eingelegt.

Die Reinheit und die Konzentration der RNA-haltigen Lösungen wurden mittels UV-Spektroskopie (220-300 nm) bestimmt.

4A.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA nach Chomczynski and Sacchi (1987)

5 g Gewebe wurden in 15 ml Homogenisierungs-Puffer und 0.07 % (v/v) β -Mercaptoethanol suspendiert und mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. In Form des Homogenisats ist die Aufbewahrung des Gewebes für die RNA-Präparation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für einige Monate möglich. Der Gewebeaufschluss wurde in ein RNase-freies SS-34-Röhrchen überführt, mit 1.5 ml 2 M Natriumacetat, pH 4.0, 15 ml H_2O -gesättigtem Phenol und mit 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 49:1) versetzt, invertiert und 15 min in Eis gekühlt. Zur schnelleren Einstellung des Phasengleichgewichts wurde 20 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 8 000 rpm im SS-34 Rotor zentrifugiert. Die abpipettierte wässrige Phase wurde mit 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) extrahiert, indem das Gemisch 15 min in Eis gekühlt und 20 min bei 6 000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im SS-34 Rotor zentrifugiert wurde. Nach zweimaliger Extraktion wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen an 2-Propanol versetzt und die RNA bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h gefällt. Zur Sedimentation der RNA wurde 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 8 000 rpm im HB-4 Rotor zentrifugiert. Das Sediment wurde in 3 ml Homogenisierungs-Puffer und 21 μl β -Mercaptoethanol resuspendiert und mit 3 ml 2-Propanol und 300 μl 2 M Natriumacetat, pH 4.0 erneut für 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Anschließend wurde 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 13 000 rpm im HB-4 Rotor zentrifugiert, das Sediment zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und zwischen den Waschschritten wie zuvor zentrifugiert. Die präzipitierte RNA wurde in RNase-freiem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen und 15 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelöst.

Homogenisierungs-Puffer:	4	M	Guanidiniumthiocyanat
	25	mM	tri-Natriumcitrat, pH 7.0
	0.5	% (w/v)	Natrium-lauroyl-sarkosin

H_2O -gesättigtes Phenol:	4 g Phenol wurden bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 1 ml DEPC-Wasser gelöst.
---	--

4A.6.2 Isolierung von mRNA

Zur direkten Isolierung von polyadenylierter RNA aus eukaryontischem Gewebe wurde das QickPrep™ Micro mRNA Isolierungssystem verwendet. Hierfür wurden 0.1 g Gewebe in 0.4 ml Extraktions-Puffer (Pharmacia, enthält Guanidiniumthiocyanat und Natrium-lauroyl-sarkosin) unter Verwendung eines Ultra-Turrax homogenisiert. Gleichzeitig wurden 1 ml Oligo(dT)-Cellulosesuspension zentrifugiert, um den Lagerungs-Puffer zu entfernen. Für die sich anschließende Isolierung der mRNA wurde das Homogenisat mit dem doppelten Volumen an Elutions-Puffer aufgefüllt und 3 min mit der sedimentierten Oligo(dT)-Cellulose gemischt. Die Suspension wurde 10 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Nukleinsäuren wurde die Oligo(dT)-Cellulose fünfmal mit jeweils 1 ml Hochsalz-Puffer und danach zweimal mit jeweils 1 ml Niedrigsalz-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Oligo(dT)-Cellulose in 0.3 ml Niedrigsalz-Puffer resuspendiert und in eine MicroSpin-Säule überführt, die anschließend in einem Eppendorfgefäß 5 sec zentrifugiert wurde. Vor der Elution der gebundenen mRNA wurde die Säule noch weitere dreimal mit 0.5 ml Niedrigsalz-Puffer gewaschen. Die Gewinnung der gebundenen mRNA erfolgte durch den Auftrag von 0.2 ml auf 65 °C erwärmten Elutions-Puffer und anschließender Zentrifugation. Der Elutionsschritt wurde jeweils zweimal durchgeführt. Die in Lösung vorliegende mRNA wurde durch Zugabe von 10 µl Glycogen-Lösung (10 mg/ml), 40 µl KOAc-Lösung (2.5 M, pH 5) sowie 1 ml Ethanol gefällt und unter Ethanol bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Elutions-Puffer:	10	mM	Tris-HCl, pH 7.4
	1	mM	EDTA
Hochsalz-Puffer	10	mM	Tris-HCl, pH 7.4
	1	mM	EDTA
	500	mM	NaCl
Niedrigsalz-Puffer	10	mM	Tris-HCl, pH 7.4
	1	mM	EDTA
	100	mM	NaCl

25 mg/ml Oligo(dT)-Cellulose-Suspension

4A.7 Synthese von cDNA aus mRNA

Die nach (4A.6.2) isolierte mRNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als Primer wurde ein Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer verwendet, der mit dem 3'-Terminus der mRNA hybridisiert und als Startpunkt für die Reverse

Transkriptase dient. Diese Prozedur ermöglicht das Arbeiten mit DNA anstelle von Hydrolyse-empfindlicheren RNA. In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurden 2.5 µg mRNA, die vorher bei 94 °C denaturiert und anschließend in Eis gelagert wurde, 2 µl DTT (0.1 M), 4 µl 5 x „first strand buffer“, 1 µl dNTP-Mix, 0.5 µg Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer, 4.5 µl H₂O und 200 U SuperScript II Reverse Transkriptase gemischt und 60 min bei 37 °C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Erwärmen auf 95 °C terminiert. Das entstandene RNA-cDNA-Hybrid wurde in 1:10-Verdünnungen bis zum Einsatz in der Polymerase-Ketten-Reaktion (4A.8) bei –20 °C gelagert.

4A.8 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Methode zur spezifischen Amplifikation von Nukleinsäuremolekülen. Hierbei werden zwei Oligonukleotid-Primer verwendet, die komplementär zu den jeweiligen Enden des zu vervielfältigenden Nukleinsäurefragments sind und als Startpunkte der hitzestabilen *Taq*-DNA-Polymerase dienen. Über mehrere Zyklen kann so ein spezifisches DNA-Fragment exponentiell vervielfältigt werden. Bei der einzusetzenden Nukleinsäure kann es sich sowohl um chromosomale DNA als auch um mRNA handeln. Bei der Amplifizierung von mRNA ist es jedoch notwendig, diese zuerst mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA (4A.7) umzuschreiben.

PCR-Ansatz:	1	µl	DNA-Template
	4	µl	Oligonukleotid-Primer (5 pmol/µl)
	3	µl	50 mM MgCl ₂ -Lösung
	2	µl	dNTP-Mix, (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
	10	µl	10 x PCR-Puffer
	75.5	µl	H ₂ O _{bidest}

Vor der Zugabe von 2.5 Units *Taq*-Polymerase wurde der PCR-Ansatz 5 min im Thermocycler bei 94 °C denaturiert. Daraufhin wurde das Temperatur-Zeit-Programm des Thermocyclers durchgeführt. Die Zyklenzahl variierte zwischen 35 und 40 Zyklen, wobei der Zyklusaufbau den molekularen Vorgängen während der PCR entspricht. Im ersten Schritt wird die DNA 1 min bei 94 °C denaturiert. Im zweiten Schritt erfolgt bei der gemittelten Schmelztemperatur beider Primer ihre Hybridisierung mit dem komplementären DNA-Strang. Im dritten Schritt wird wieder auf 72 °C erwärmt und damit die Synthese des Sekundärstranges ermöglicht, da die verwendete *Taq*-Polymerase bei dieser Temperatur ihre höchste Aktivität besitzt. Danach beginnt der

neue Zyklus wieder bei 94 °C. Parallel zum PCR-Ansatz wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne DNA-Template verwendet.

10 x PCR-Puffer:	100	mM	Tris/HCl, pH 8.3
	500	mM	KCl
	15	mM	MgCl ₂
	0.01	%	Gelatine

4A.9 Reinigung von Nukleinsäuren

4A.9.1 Phenolextraktion von DNA-haltigen Lösungen

Die Phenolextraktion dient zur Entfernung von Proteinverunreinigungen aus wässrigen DNA-Lösungen. Dazu wurden diese Lösungen mit dem einfachen Volumen an mit TE-Puffer gesättigtem Phenol (3.14) versetzt, zur Phasenvermischung mehrmals invertiert und zur schnelleren Einstellung des Phasengleichgewichts 2 min bei 4 °C und 3 000 rpm in einer Sorvall-Zentrifuge sedimentiert. Um noch vorhandene Phenolreste in der wässrigen Lösung zu entfernen, wurde diese anschließend zweimal mit dem selben Volumen einer Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (im Verhältnis 24:1) extrahiert. Zur Konzentrierung wurde die DNA wie unter (4A.9.3) beschrieben präzipitiert.

4A.9.2 Reinigung von DNA-haltigen Lösungen mit Qiaquick-Säulen, Qiagen

Die durch PCR amplifizierte cDNA wurde mittels Qiaquick-Säulen von Primern, Nukleotiden, Salzen und Polymerasen gereinigt. Dabei binden DNA-Fragmente >40 bp in Gegenwart von chaotropen Salzen an die in den Qiaquick-Säulen vorliegende Silikagelmembran, während alle Kontaminationen durch die Membran hindurchfließen. Die Elution der gebundenen DNA erfolgt entweder mit 50 µl Tris-HCl (10 mM, pH 8.5) oder 50 µl H₂O_{bidest.} Das Reinigungsprotokoll entsprach vollkommen der von Qiagen, 1998 vorgegebenen Prozedur.

4A.9.3 Präzipitation von Nukleinsäuren

Wässrige Nukleinsäure-Lösungen wurden entweder mit einem 2.5-fachen Volumen an Ethanol oder mit dem einfachen Volumen an 2-Propanol unter Zusatz des 0.1-fachen Volumens an Natriumacetat bei –20 °C mindestens eine Stunde gefällt.

4A.10 Nachweis von Nukleinsäuren

4A.10.1 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrations- bzw. Reinheitsbestimmung von wässrigen Nukleinsäure-Lösungen wurden Absorptionsmessungen im UV-Bereich zwischen 220 bis 300 nm durchgeführt, da deren Absorptionsmaximum aufgrund der aromatischen Ringsysteme bei einer Wellenlängen von 260 nm liegt. Die Absorptionsmessungen wurden in einem DU70-Spektralphotometer in 100 µl-Quarzküvetten durchgeführt, wobei eine Absorptionseinheit 1 A_{260} einer Konzentration von 50 µg DNA/ml entspricht. Bei RNA-Lösungen entspricht eine Absorptionseinheit bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient der Absorptionswerte A_{260}/A_{280} diene als Reinheitsmaß der untersuchten DNA-Lösung und sollte bei proteinfreien Nukleinsäure-Lösungen zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

4A.10.2 Native Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von DNA

Die Trennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe erfolgte in 0.7-2 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer (Maniatis et al., 1989). Das hierbei für die verwendeten Elektrophoreseapparaturen jeweils benötigte Gelvolumen ist in Tab. 4.1 aufgeführt. Die bei 100 °C suspendierte Agaroselösung wurde in eine Horizontal-Gelelektrophoreseapparatur gegossen und zur Aussparung von Probetaschen ein Taschenkamm eingesetzt. Nach dem Erstarren der Agaroselösung wurde das Gel mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Zur Beladung des Gels wurden die DNA-Proben mit dem 0.2-fachem Volumen an Auftrags-Puffer versetzt und in die Probetaschen pipettiert. Die maximal angelegte Spannung betrug bei Minigelen 90 Volt und bei Midi- bzw. Maxigelen 130 Volt.

Tab. 4.1 Größen der verwendeten Horizontal-Gelelektrophoreseapparaturen

Gelelektrophoreseapparatur	Maße der Apparatur	Gelvolumen
Maxigel	21 cm x 19.5 cm	200 ml
Midigel	9.5 cm x 19.5cm	100 ml
Minigel	5.0 cm x 8 cm	20 ml

Zur Detektion der DNA-Moleküle wurden die Gele kurz vor Ende der Gelelektrophorese 5 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (50 µg/ml) geschwenkt. Der Fluorophor interkaliert in die DNA und ermöglicht somit deren Detektion im Gel unter UV-Bestrahlung. Um ein besseres Signal/Hintergrund-Verhältnis zu erzielen, wurde das Gel nach dem Anfärben kurz gewässert und anschließend noch einmal 15 min der Elektrophorese unterworfen, da nicht an DNA gebundenes Ethidiumbromid aufgrund

seiner positiven Ladung zur Kathode wandert. Die unter UV-Bestrahlung sichtbar gewordenen DNA-Banden wurden zur Dokumentation mit einer Polaroid-Kamera photographiert. Als Standard für doppelsträngige DNA wurden die unter (3.13) beschriebenen DNA-Mischungen definierter Größe parallel zu den zu untersuchenden Proben elektrophoretisch aufgetrennt.

DNA-Auftrags-Puffer:	50	% (v/v)	Glycerin
	0.2	% (w/v)	SDS
	0.05	% (w/v)	Bromphenolblau
	0.05	% (w/v)	Xylenecyanol

4A.10.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von RNA nach Fourny et al. (1988)

Die Agarose wurde in 1 x MOPS-/EDTA-Puffer suspendiert, im Mikrowellenherd auf 100 °C erhitzt und nach dem Abkühlen auf 50 °C mit 5 % (v/v) Formalin-Lösung versetzt. Anschließend wurde die Agarose in die Gelapparatur gegossen und eine Schablone zur Aussparung von Probetaschen eingesetzt. Nach 30 minütigem Abkühlen der Agarose wurde das Gel mit 1 x MOPS-/EDTA-Puffer überschichtet und die bei 65 °C denaturierten RNA-Proben mit dem 4- bis 5-fachen Volumen an Auftrags-Puffer versetzt und aufgetragen. Die Färbung der RNA erfolgt durch Zugabe eines 0.2-fachen Volumens an Ethidiumbromid (1 mg/ml) vor dem Auftragen der Proben.

10 x MOPS/EDTA-Puffer:	0.2	M	MOPS
	50	mM	NaOAc
	10	mM	EDTA

RNA-Auftrags-Puffer:	0.75	ml	DMF, deionisiert
	0.15	ml	10 x MOPS-Puffer
	0.24	ml	Formalin-Lösung
	0.10	ml	DEPC-H ₂ O
	0.10	ml	Glycerin
	0.80	ml	10 %ige (w/v) Bromphenolblau

4A.11 Enzymatische Modifikation von DNA

4A.11.1 DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen

Isolierte DNA-Moleküle wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Bei den verwendeten Puffern sowie den Reaktionsbedingungen wurden die Herstellerangaben befolgt. Die vollständige Restriktion der DNA wurde bei jedem Ansatz durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft (4A.10.2).

4A.11.2 Ligation von PCR-generierten DNA-Fragmenten

Die bei der PCR verwendete thermostabile *Taq*-Polymerase fügt an das 3'-Ende der von ihr amplifizierten DNA sequenzunabhängig einzelne Desoxyadenosinreste an. Dieser Umstand kann für eine effiziente Klonierung der PCR-Produkte benutzt werden. Die nach (4A.8) hergestellten PCR-Produkte wurden mittels Säulenchromatographie (4A.9.2) gereinigt und in den T-Vektor pGem-T (3.11.1) ligiert, der 3'-überhängende Thymidinreste besitzt. Dabei wurden molare Insertion zu Vektor Verhältnisse von 3:1 bis 1:3 verwendet.

Zur einfachen Berechnung der in die Ligation einzusetzenden Menge an PCR-Produkt ist folgende Formel verwendet worden.

$$\text{T-Vektor [ng]} \times \frac{\text{PCR-Produktgröße [kb]}}{\text{Vektorgöße [kb]}} \times \text{molares Verhältnis von Insertion zu Vektor} = \text{Insertion [ng]}$$

Für die Ligation wurden jeweils 1 µl pGem-T-Vektor (50 ng), 1 µl 10x Ligations-Puffer, 1 µl T4-Ligase und die entsprechende Menge an zu inserierendem PCR-Produkt gemischt und mit H₂O, dest. auf 10 µl aufgefüllt. Die Ligation wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz zur Transformation von *E.coli* DH5α-Zellen verwendet.

10x Ligations-Puffer:	300	mM	Tris-HCl, pH 7.8
	100	mM	MgCl ₂
	100	mM	DTT
	10	mM	ATP

4A.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach der von Sanger, 1977 beschriebenen Kettenterminationsmethode. Hierbei wird mit Hilfe der T7-Polymerase ausgehend von einem denaturierten Template ein radioaktiv markierter, komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Durch die Zugabe von Didesoxynukleotiden werden statistisch verteilte Kettenabbrüche induziert. Die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der so erzeugten DNA-Fragmente und Visualisierung des Gels mit einem Röntgenfilm ermöglicht das „Lesen“ der Nukleinsäuresequenz in Form eines Strichcodes und die Bestimmung der entsprechenden Basenabfolge.

Zur Sequenzierung wurde Plasmid-DNA eingesetzt, die entweder mittels Qiagen®-Präparation (4A.5.2) oder Miniplasmid-Präparation (4A.5.1) gereinigt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde das T7 Sequenzier-System von Pharmacia verwendet. Die Durchführung der Sequenzierreaktion erfolgte gemäß den Herstellerangaben und ist ausführlich bei Oberthür, 1996 beschrieben.

4A.13 Hybridsierungstechniken

Synthese von cRNA-Sonden mittels in vitro-Transkription

Zur *in situ*-Hybridisierung wurden Digoxigenin-markierte cRNA-Sonden verwendet. Die Markierung erfolgt mittels *in vitro*-Transkription von cRNA in Gegenwart von Digoxigenin-markiertem Uridintriphosphat. Bei der *in vitro*-Transkription wird eine DNA-Sequenz in RNA-Sequenz übersetzt, die sich stromabwärts eines RNA-Polymerase Promotors befindet. Die gängigen Plasmidvektoren besitzen im Allgemeinen zwei RNA-Polymerase Promotoren, die gegenläufig die Multiple-Klonierungs-Stelle begrenzen. Somit ist es möglich, die beiden DNA-Stränge der Insertion eines rekombinanten Plasmids in die jeweilige komplementäre RNA-Sequenz zu überführen.

Zur Herstellung einheitlich langer cRNA-Fragmente werden bei der *in vitro*-Transkription linearisierte DNA-Matrizen verwendet.

Im Standard-Ansatz wurde 1 µg gereinigte, linearisierte Matrizen-DNA mit der entsprechenden RNA-Polymerase und einem Nukleotid-Markierungsgemisch, bestehend aus 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0.65 mM UTP und 0.35 mM Digoxigenin-UTP, in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Durch die Zugabe von 20 Units RNase-Inhibitor wird der hydrolytische Abbau der cRNA verhindert. Nach 2 h bei 37 °C wurde anschließend die DNA-Matrize durch hydrolytischen Abbau mittels DNase (10 Units, RNasefrei; 15 min Inkubation bei 37 °C) aus der Reaktionsmischung entfernt und durch Zugabe von 2 µl EDTA-Lösung (0.2 M, pH 8.0) die *in vitro*-Transkription abgestoppt. Die Digoxigenin-markierte cRNA wurde mit 2.5 µl LiCl-Lösung (4 M) und 75 µl gekühltem Ethanol 30 min bei –70 °C präzipitiert, danach bei 12 000 g zentrifugiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das cRNA-Pellet wurde anschließend in 100 µl DEPC-behandeltem H₂O_{bidest}, das 20 Units RNase-Inhibitor enthält, gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei –70 °C gelagert.

Die qualitative Überprüfung der markierten cRNA-Sonden erfolgte mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese (4A.10.3). Nach dem Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten cRNA auf Nitrocellulose wurde die Digoxigenin-Markierung der cRNA mit anti-Digoxigenin-Antikörpern nachgewiesen (4A.13.1).

Quantifizierung der Digoxigenin-markierten cRNA

Vor dem Einsatz der so synthetisierten cRNA als Sonde in *in situ*-Hybridisierungen wurde die Konzentration mit DIG Quantifizierungs-Teststreifen bestimmt. Hierbei wurden ausgehend vom Markierungsansatz fünf Verdünnungen hergestellt, von denen jeweils 1 µl auf die fünf Testfelder eines frischen DIG Teststreifens aufgetragen wurden. Als Konzentrationsreferenz dienten DIG Kontroll-Teststreifen, die mit fünf Verdünnungsstufen einer exakt definierten Dig-markierten Kontroll-DNA beladen sind.

Beide Teststreifen wurden einer immunologischen Detektion mit Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment-aP und anschließender Substratreaktion mit NBT/BCIP unterzogen (C4.6, siehe auch die dort verwendeten Lösungen). Aufgrund der handlichen Größe der Teststreifen konnte die Detektion in 2.5 ml Greiner-Plastikgefäßen durchgeführt werden, wobei jeweils ein Teststreifen mit einem Kontrollstreifen „Rücken an Rücken“ in einem Gefäß entwickelt wurden. Die Entwicklung der Teststreifen entsprach der folgenden Sequenz:

Blockierungslösung, 2 min

Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment-aP, 1:2000 in Blockierungslösung, 3 min

Blockierungslösung, 1 min

Waschschritt mit Dig I-Puffer, 1 min

Äquilibration mit Dig II-Puffer, 1 min

Substratreaktion mit NBT/BCIP-Lösung, bis zu 30 min

Durch Vergleich mit den parallel entwickelten Kontrollstreifen wurde die Konzentration der Dig-markierten cRNA bestimmt sowie unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte die Gesamtmenge an Dig-markierter cRNA im Markierungsansatz berechnet.

4A.13.1 Northern Blot-Analyse von RNA

Zum Nachweis des Vorkommens von mRNA-Sequenzen wurde die Gesamt-RNA eines Gewebetyps elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Hybond Nylon-Membranen immobilisiert. Die so fixierten RNA-Moleküle wurden mit den wie unter 4A.13 beschrieben hergestellten komplementären cRNA-Sonden hybridisiert, wobei deren Dig-Markierung den Nachweis spezifischer Wechselwirkungen mit der Ziel-mRNA mittels immunologischer Methoden ermöglichte.

Transfer von RNA auf Nylonmembranen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA-Moleküle (4A.10.3) wurden diese auf Hybond Nylon-Membranen transferiert. Hierzu wurden die Agarosegele nach der Dokumentation mehrmals in 20 x SSC-Lösung geschwenkt, um das für die Auftrennung verwendete Formalin aus dem Gel zu entfernen. Parallel dazu wurde der Kapillarblot in den bereits vorher verwendeten Gelelektrophorese-Apparaturen für den anschließenden Transfer vorbereitet. Der Aufbau erfolgte gemäß dem folgenden Schema: Zwei Lagen Whatman 3 MM Filterpapier wurde auf die Gelauftragfläche der Apparatur gelegt, wobei die Enden der Papierstreifen jeweils in die 20 x SSC-Lösung der Elektrophorese-Tanks tauchten. Danach wurden das Agarosegel, das an den Kanten

mit Parafilm abgedeckt wurde, die zurechtgeschnittene Nylon-Membran und 4 Lagen Whatman 3 MM Filterpapier aufgelegt. Für die Kapillarwirkung sorgte eine 10 cm hohe Schicht an zurechtgeschnittenen Papiertüchern, die mit einem 2 kg-Gewicht beschwert wurden. Der Transfer der RNA-Moleküle erfolgte 18 h bei RT. Anschließend wurde die Nylonmembran in Klarsichtfolie verpackt und 7 min unter UV-Licht fixiert. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde die RNA auf der Nylon-Membran mit Methylenblau-Lösung angefärbt. Bis zur Verwendung der Membran in Hybridisierungsexperimenten wurde diese bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Methylenblau-Färbelösung:	0.5	M	Natriumacetat, pH 5.2
	0.04	% (w/v)	Methylenblau

Hybridisierung von Ribonukleinsäuren mit Digoxigenin-markierter cRNA

Die Hybridisierung erfolgte in Plexiglasröhren, die in einem thermostatisierbaren Hybridisierschrank um eine feste Achse rotierten. Um unspezifische Bindungen der Sonde an die Nylonmembran zu verhindern, wurde der eigentlichen Hybridisierung eine Prähybridisierung vorangestellt, bei der jeweils 15 ml Prähybridisier-Lösung 1 h bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit der Membran inkubiert wurden.

Daraufhin erfolgte bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht die Hybridisierung mit 20 ml Prähybridisier-Lösung, die mit der Digoxigenin-markierten cRNA auf eine Sondenkonzentration von 40 ng/ml eingestellt wurde. Zur Abtrennung unspezifisch gebundener cRNA-Fragmente wurde der Filter zweimal 15 min mit 2 x SSC/0.1 % (w/v) SDS, zweimal 30 min mit 0.2 x SSC/0.1 % SDS und abschließend zweimal 30 min mit 0.05 x SSC/0.1 SDS bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gewaschen. Anschließend wurden die Filter in 2 x SSC auf RT abgekühlt. Die Detektion der cRNA-RNA-Hybride erfolgte über das gekoppelte Digoxigenin mittels Anti-Digoxigenin-Antikörper, an die alkalische Phosphatase gekoppelt ist (Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment-aP). Hierfür wurde die Membran 5 min in Dig I-Puffer äquilibriert und zur Absättigung der Membran 1 h bei RT in Dig I-Puffer/1 % Blocking-Lösung geschwenkt. Anschließend wurde die Nylon-Membran 30 min in frischer Blocking-Lösung, die auf 1:15000 Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment-aP eingestellt war, inkubiert. Nach der Erstantikörper-Reaktion wurde die Membran zweimal 15 min mit Dig I-Puffer gewaschen, um überschüssig gebundene Antikörper zu entfernen. Die Detektion von gebundenen Antikörpern erfolgte über das konjugierte Enzym alkalische Phosphatase. Hierfür wurde die Membran 2 min mit Dig II-Puffer äquilibriert, um für die Enzymreaktion optimale Bedingungen einzustellen. Als Substrat wurde CSPD, Roche verwendet. Die Dephosphorylierung des Substrats führt zu einem metastabilen Phenolat-Anion, das beim Zerfall Licht der Wellenlänge von 477 nm emittiert und mit Röntgenfilmen detektiert werden kann. Das Substrat wurde in einer 1:100 Verdünnung in Dig II-Puffer auf die Membran aufgetragen und die Membran 5 min bei RT damit inkubiert. Danach wurde die überschüssige Flüssigkeit vom Filter entfernt und dieser in

Plastikfolie eingeschweißt. Zum schnelleren Erreichen des „steady-state“-Zustandes wurde die eingeschweißte Membran vor Auflegen des Röntgenfilms 15 min bei 37 °C aufbewahrt.

Prähybridisier-Lösung:	5	x	SSC
	50	% (v/v)	DMF, deionisiert
	5	x	Denhardt's
	1	% (w/v)	SDS

4A.13.2 *In situ*-Hybridisierung an Gewebeschnitten

Die *in situ*-Hybridisierung ermöglicht die zelluläre Lokalisation von mRNA-Transkripten, den primären Produkten der Genexpression direkt im Gewebeschnitt. Hierfür wird eine markierte Nukleinsäure-Sonde direkt auf einen Gewebeschnitt appliziert, wo sie mit der zu ihr komplementären mRNA stabile Sonde-mRNA-Doppelstränge ausbildet. Nach dem Entfernen überschüssiger, nicht spezifisch hybridisierter Sonde erfolgt die Identifizierung des transkriptbildenden Zelltyps über den vorliegenden markierten Doppelstrang.

Entscheidend für den Erfolg dieser Technik ist die Existenz intakter mRNA im Gewebeschnitt. Um dem Abbau der Ribonukleinsäuren durch RNasen vorzubeugen, wurden die unter 4A.6 beschriebenen Vorkehrungen bei der Gewebe- und Schnittpräparation sowie der Durchführung der Hybridisierung getroffen.

Präparation von Gewebeschnitte

Für die *in situ*-Hybridisierung mit cRNA-Sonden wurden mit Paraformaldehyd-Lösung fixierte Schweinegehirne verwendet. Das schlachtfrische Material wurde in 1 cm x 1cm große Gewebeblöcke geschnitten und anschließend 4 h bei 4 °C mit frisch hergestellter 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Danach wurden die Gewebeblöcke dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und über Nacht bei 4 °C in Saccharose-haltiger PBS-Lösung (25 %ig) geschwenkt. Die Gewebeschnitte wurden in einem auf –20 °C temperierten Kryostaten präpariert. Hierfür wurden die vorbehandelten Gewebestücke in Tissue Tek Einbettmedium auf dem Gewebehalter langsam eingefroren. Die 16 µm dicken Gewebeschnitte wurden auf Superfrost Objektträger von Menzel aufgezogen und bis zum Gebrauch bei –80 °C in Objektträgerkästen aufbewahrt.

Bei Verwendung der Oligonukleotid-Sonde für die *in situ*-Hybridisierung wurde unfixiertes Schweinehirn verwendet. Die schlachtfrischen Gewebeblöcke wurden hierfür sofort über Isopentan, das mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, eingefroren und bis zur Herstellung der Schnitte bei –80 °C gelagert. Eine Stunde vor dem Schneiden des unfixierten Materials wurden die Gewebeblöcke von –80°C in den auf

-20 °C temperierten Kryostaten überführt, um das Gewebe auf die Schneidetemperatur zu äquilibrieren.

4A.13.2.1 *In situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden

Die Hybridisierungen wurden an fixierten Kleinhirn- und Cortexschnitten des Schweinehirns durchgeführt. Die zuvor bei -80 °C gelagerten Schnitte wurden vor der *in situ*-Hybridisierung auf einer Heizplatte getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 15 min mit PBS-Puffer/0.3 % Tween permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer für 5 min wurden die Schnitte 30 min bei 37 °C mit 0.05 µg Proteinase K-Lösung in TE-Puffer behandelt. Daraufhin wurde 5 min mit PBS-Lösung/100 mM Glycin gewaschen. Zur Acetylierung der Schnitte wurden diese anschließend zweimal 10 min mit Triethanolamin-Lösung (0.1 M, pH 8.0) behandelt, die unmittelbar vor Verwendung auf 0.25 % (v/v) Essigsäureanhydrid eingestellt wurde. Vor der Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten cRNA wurden die Schnitte dehydratisiert und an der Luft getrocknet. Dazu wurden die Schnitte nacheinander jeweils 5 min in 30 %, 50 %, 80 % und 96 % wässrige Ethanol-Lösung, in reines Ethanol und abschließend in Chloroform getaucht. Mit 4 x SSC/50 % DMF wurden die Schnitte 30 min bei 42 °C in einer feuchten Kammer auf die Hybridisierung vorbereitet. Die eigentliche Hybridisierung mit der spezifischen cRNA-Sonde erfolgte mit einer Sondenkonzentration von 0.5 ng pro µl Hybridisierungs-Puffer bei 42 °C über Nacht in einer abgeschlossenen Glaskammer, die mit in 4 x SSC/50 % DMF getränkten Tüchern ausgelegt wurde, damit die Schnitte nicht austrocknen. Nach der Hybridisierung ist das RNase-freie Arbeiten nicht mehr notwendig, da die gebildeten cRNA/mRNA-Doppelstränge stabil gegenüber dem Abbau durch Nukleasen sind. Zur Entfernung nicht hybridisierter oder unspezifisch gebundener Sonde schlossen sich nach der Hybridisierung folgende Waschschrte an:

5 min mit 2 x SSC, RT
15 min mit 2 x SSC, 45 °C
30 min mit 2 x SSC/50 % DMF, 45 °C
2 x 30 min mit 0.2 x SSC/50 % DMF, 45 °C

Nach dem letzten Waschschrte wurden die Schnitte dreimal 15 min in Dig I-Puffer geschwenkt, um sie auf die nachfolgende Immundetektion der cRNA-mRNA-Hybride vorzubereiten. Um unspezifische Bindungen des anti-Digoxigenin-Antikörpers im Gewebeschnitt zu verhindern, wurden die Schnitte zunächst mit 5 % BSA/0.3 % Tween in Dig I-Puffer behandelt. Die Antikörperreaktion erfolgte anschließend mit Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment-aP in Dig I-Puffer (1:500 Verdünnung), der 2 % BSA/0.1 % Tween enthielt, für 2 h bei RT. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges

Waschen mit Dig I-Puffer entfernt. Für die sich anschließende Detektion der gebundenen Antikörper wurden die Gewebeschnitte 10 min mit Dig II-Puffer gewaschen. Nach Reaktion mit BCIP in Gegenwart von NBT (siehe C4.6) ist das Vorkommen von Transkripten in einem Zelltyp ist durch ein violett gefärbtes Cytoplasma zu erkennen.

Hybridisierungs-Puffer:	4	x	SSC
	1	x	Denhardt's
	40	% (v/v)	DMF
	10	% (w/v)	Dextransulfat
	1	mg/ml	t-RNA, Hefe
	1	mg/ml	Heringssperma-DNA

4A.13.2.2 *In situ*-Hybridisierung mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Oligonukleotiden

Für die *in situ*-Hybridisierung mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Oligonukleotiden wurden unfixierte Gewebeschnitte des Schweinecerebellums verwendet. Die Schnitte wurden getrocknet und anschließend bei -80°C gelagert. Das Hybridisierungsprotokoll entspricht der von Augood et al., 1994 beschriebenen Methode.

Die Gewebeschnitte wurden hierfür nach ihrem Entfernen aus dem Gefrierschrank sofort mit einem Fön getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 5 min in eisgekühlter, frisch angesetzter Paraformaldehyd-Lösung (4 %ig) fixiert, in 1x PBS-Lösung gewaschen, seriell mit 70, 95 und 100 % Ethanol dehydratisiert und abschließend 30 min an der Luft getrocknet. Die Hybridisierung erfolgte mit 12 fmol alkalischer Phosphatase-gekoppeltem Oligonukleotid pro Mikroliter Hybridisierungs-Puffer bei 37°C in einer feuchten Kammer über Nacht. Die feuchte Kammer ist eine mit Papiertüchern (in 4 x SSC getränkt) ausgelegte, verschließbare Glasschüssel, die ein Austrocknen der Schnitte verhindern soll. Bis zur Hybridisierung wurde Sonde bei 4°C in 30 mM Tris-HCl, pH 7.6, 3 M NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM ZnCl_2 , 0.05 % NaN_3 aufbewahrt, um die Aktivität der gekoppelten alkalischen Phosphatase zu erhalten.

Um die Hybridisierungs-Lösung zu entfernen, wurden die Schnitte bei RT mit 1 x SSC-Lösung gespült. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde wurden die Schnitte anschließend dreimal 30 min in 1 x SSC bei 55°C getaucht. Anschließend wurden die Schnitte in 1 x SSC-Lösung auf RT abgekühlt und 30 min in 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl geschwenkt. Die aP-Substratreaktion erfolgte analog zu der unter (4A.13.2.2) beschriebenen Methode.

Hybridisierungs-Puffer:	4	x	SSC
	50	% (v/v)	DMF, deionisiert
	1	x	Denhardt's
	250	µg/ml	Heringssperma-DNA

4B Proteinchemische Methoden

4B.1 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen

4B.1.1 UV-spektroskopische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinbestimmung nach Layne (1957)

Bei dieser spektralphotometrischen Methode wird über die Absorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bei einer Wellenlänge von 280 nm die Konzentration von reinen Protein-Lösungen bestimmt. Die Messung erfolgt in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm, wobei das reine Lösungsmittel als Referenz dient.

Über folgende Näherungsformel wird die Proteinkonzentration aus dem Absorptionswert abgeschätzt, falls der molekulare Extinktionskoeffizient des Proteins nicht bekannt ist.

$$1 A_{280 \text{ nm}}\text{-Einheit} \approx 1 \text{ mg Protein/ml}$$

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Warburg und Christian (1942)

Bei diesem Verfahren werden Verunreinigung von Protein-Lösungen durch Nukleinsäuren berücksichtigt, indem deren Absorption bei 260 nm in die Berechnungsformel für die Proteinkonzentration integriert wird.

$$(1.55 \times A_{280 \text{ nm}}) - (0.76 \times A_{260 \text{ nm}}) \approx \text{Proteingehalt [mg/ml]}$$

Diese Methode bietet sich für die schnelle Proteinkonzentrationsbestimmung von Zell- oder Gewebeaufschlüssen an, in denen die Nukleinsäuren noch nicht von den Proteinen abgetrennt worden sind.

4B.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test

Die Proteinkonzentration von Detergentshaltigen Protein-Lösungen wurde mittels BCA-Test bestimmt. Bei diesem Testsystem wird die Reduktion zweiwertiger Kupfer-Ionen

durch Proteine in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion) in Kombination mit der selektiven Chelatisierung von Kupfer(I)-Ionen durch Bicinchoninsäure (BCA) zur Konzentrationsbestimmung genutzt (Smith et al., 1985). Der violette, wasserlösliche Cu(I)-BCA₂-Komplex weist eine starke Absorption bei 562 nm auf. Die Proteinkonzentration wird letztlich durch den Absorptionsvergleich mit analog behandelten BSA-Eichlösungen bekannter Konzentration ermittelt. Die Absorptionsänderung bei dieser Wellenlänge ist linear für Proteinkonzentrationen im Bereich von 20-2000 µg/ml.

Das BCA-Arbeitsreagenz setzt sich aus 50 Teilen einer von der Firma Pierce bezogenen 0.1 M NaOH-haltigen BCA-Lösung (Reagenz A) und einem Teil einer 4 %igen Kupfer(II)sulfat-Lösung (Reagenz B) zusammen und ist bei RT einen Tag haltbar. Die zur Proteinkonzentrationsbestimmung notwendige Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin hergestellt. Für den BCA-Test wurden jeweils 25 µl der Eichlösung oder der Proteinproben unbekannter Konzentration mit 200 µl der BCA-Arbeitslösung in einer Kavität einer Mikrotiterplatte gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 37 °C wurde nach dem Abkühlen die Absorption (562 nm) der einzelnen Kavitäten mit einem ELISA-Reader bestimmt.

4B.1.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford, 1976

Im Bradford-Test wird die Proteinkonzentration einer Lösung durch die proteininduzierte Veränderung des Absorptionsverhaltens des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 bestimmt. Durch die Bindung des Farbstoffes an Proteine wird dieser in sein Anion mit verändertem Absorptionsmaximum (595 nm) überführt. Die Eichgerade für den Bradford-Test wurde mit Rinderserumalbumin vermessen; als Bradford-Reagenz wurde die Coomassie-Färbelösung Roti[®]-Quant (Roth) verwendet.

Zur Bestimmung von Konzentrationen im Bereich von 0.2-1.0 mg Protein/ml wurde der sogenannte *Makroansatz* benutzt. Hierfür wurde die fünffach-konzentrierte Färbelösung mit H₂O_{bidest} bis zur einfach-konzentrierten Lösung verdünnt und durch einen Papierfilter filtriert. Für die Messung wurden jeweils 20 µl Protein-Lösung mit 1 ml Einfach-Färbelösung gemischt. Zur Bestimmung von Konzentrationen im Bereich von 1-20 µg Protein/ml wurde der Mikroansatz verwendet, bei dem jeweils 800 µl Protein-Lösung mit 200 µl unverdünnter Färbelösung gemischt wurden. Die Messung erfolgte in Polystyrol-Küvetten (d = 1 cm) bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen eine Referenz von Proben-Puffer und Einfach-Färbelösung.

4B.2 Konzentrierung von Protein-Lösungen

4B.2.1 Konzentrierung mittels Ultrafiltration

Die Ultrafiltration von Protein-Lösungen durch eine anisotrope Membran einer definierten Ausschlussgröße ermöglicht die schonende Konzentrierung verdünnter Protein-Lösungen. In Abhängigkeit des Volumens der einzuengenden Probe wird die Ultrafiltration entweder in Mikrokonzentratoren mittels Zentrifugation oder in Druckrührzellen mittels angelegtem Überdruck durchgeführt.

Ultrafiltration mit Centricon-Zentrifugationskonzentratoren

Bei Protein-Lösungen bis zu einem Volumen von 2 ml wurde die Ultrafiltration in Centricon-Mikrokonzentratoren durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben wurde für die Konzentrierung Centricon YM3 (Ausschlussgröße: 3 kDa) benutzt. Das Centricon wurde nach Herstellerangaben zusammengebaut und mit der einzuengenden Probe befüllt. Während der Konzentration bei 7 000 g im SS-34 Rotor wird die Pufferlösung und niedermolekulare Teilchen aufgrund der Zentrifugalkraft durch die Membran filtriert (Filtrat), während die Proteine oberhalb der Membran konzentriert verbleiben (Retentat). Hierdurch konnten die Protein-Lösungen bis auf ein Volumen von ungefähr 40 µl eingengt werden.

Ultrafiltration in einer Druckrührzelle

Die Konzentrierung größerer Lösungsmengen wurde je nach Ausgangsvolumen in einer 50 oder 300 ml fassenden Amicon-Druckrührzelle durchgeführt. In diese Rührzellen können Filtrationsmembranen unterschiedlicher Ausschlussgröße je nach Bedarf eingelegt werden. Nach dem Befüllen der Zelle wurde die Proteinlösung unter einem angelegten Stickstoffdruck von max. 2.5 bar durch die Membran filtriert. Bei der Verwendung der 50 ml-Zelle konnte bis auf ein Volumen von 5 ml eingengt werden, bei der 300 ml-Zelle betrug das Retentat-Endvolumen 15 ml.

4B.2.2 Konzentrierung durch Acetonfällung

Bei der denaturierenden Konzentrierung von Protein-Lösungen wurden diese mit dem vierfachen Volumen an eisgekühltem Aceton versetzt und 1 h bei -20°C gefällt. Die ausgefällten Proteine wurden bei 12 000 g zentrifugiert und das Sediment an der Luft getrocknet.

4B.3. Änderung der Pufferbedingungen von Protein-Lösungen

4B.3.1 Dialyse von Protein-Lösungen

Mit Hilfe der Dialyse durch eine semipermeable Membran entlang eines Konzentrationsgradienten können Protein-Lösungen entsalzt oder Pufferlösungen vollständig ausgetauscht werden. Die Dialyse der Proteinlösung erfolgte zweimal 2 h und im letzten Schritt über Nacht gegen das 1000 fache Volumen der auszutauschenden Lösung. Für die Dialyse größerer Lösungsmengen wurden Dialyseschläuche mit einem Ausschlußvolumen von 12-14 kDa oder 3.5 kDa, in Abhängigkeit von den in der Lösung vorhandenen Proteinen, verwendet. Für die Dialyse von Protein-Lösungen geringeren Volumens und zur schnelleren Entsalzung wurden aufgrund des geringeren Proteinverlustes das Slide-A-Lyzer-Dialysesystem verwendet, bei dem die zu dialysierende Proteinlösung in eine Dialysekassette mit einem Ausschlußvolumen von 10 kDa gefüllt und danach die über der Lösung stehende Luft mit einer Spritze abgezogen wird. Durch die Kontraktion der Membran steht der Proteinlösung die größtmögliche Austauschfläche zur Verfügung, was zu einer deutlichen Verringerung der Dialysezeit führt.

4B.3.2 Gelpermeationschromatographie von Protein-Lösungen

Bei der Entsalzung von Protein-Lösungen mittels Gelpermeationschromatographie werden die Proteine von den störenden Salzen aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens durch die als Molekularsieb fungierende Matrix aufgetrennt. Während die niedermolekularen Pufferbestandteile aufgrund von Porendiffusion länger im Säulenmaterial verweilen, passieren die größeren Proteine die Säulenmatrix fast ohne Widerstand und eluieren zuerst von der Säule. Als stationäre Phase wurde Sephadex G25 in Form der kommerziell erhältlichen Säulen PD10 und Nap5 verwendet. PD10 Säulen mit einem Säulenvolumen von 9.1 ml eignen sich zur Entsalzung von Lösungen bis zu einem Volumen von 2.5 ml. Die Nap5 Säulen dagegen besitzen ein Säulenvolumen von 2.5 ml und wurden zur Entsalzung von Protein-Lösungen <750 µl verwendet. Die Vorbereitung des Säulenmaterials sowie die Durchführung des Säulenlaufes sind bei beiden Säulen bis auf die Verwendung unterschiedlicher Puffervolumina identisch. Nach der Äquilibration der Säule mit 25 ml (PD10) bzw. 5 ml (Nap5) der auszutauschenden Lösung wurde die Probe in einem Volumen von 2.5 bzw. 0.75 ml auf das Gelbett aufgetragen. Das Eluat wurde in 500 µl-Fractionen gesammelt und anschließend mittels Messung der Absorption bei 280 nm die Proteinkonzentration (4B.1.1) oder IgG-Konzentration (4C.2.1) der Proben bestimmt.

4B.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Protein-Lösungen

Die Zusammensetzung von Proteinlösung wurde in der vorliegenden Arbeit durch eindimensionale, diskontinuierliche Gelelektrophorese in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen überprüft. Hierfür wurde entweder die Gelsysteme nach Laemmli, 1970 oder nach Schägger und von Jagow, 1987 verwendet, die aus einem Trenn- und darüberliegenden Sammelgel unterschiedlichen pH-Werts und Porengröße bestehen.

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wurden die entsprechenden Lösungsbestandteile im Wasserstrahlvakuum entgast und nach Zugabe der Radikalstarter TEMED und Ammoniumperoxodisulfat (APS) sofort in Glaskassetten gegossen. Auf das polymerisierte Trenngel wurde die Sammelgel-Lösung aufgetragen und mit einem Taschenformer am oberen Rand der Gelkassette versehen. Nach der vollständigen Polymerisation des Sammelgels wurde der Taschenkamm entfernt, das zweischichtige Gel in eine vertikale Elektrophoresapparatur eingespannt und die Elektrodenkammern mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Proteinproben wurden mit Auftrags-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden sie zusammen mit einem Proteingrößenstandard (3.13) auf das Gel aufgetragen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

40 %ige Acrylamidlösung: (40 %T, 2 % C)	39.2	% (w/v)	Acrylamid
	0.8	% (w/v)	Bisacrylamid
3 x SDS-Auftrags-Puffer:	175	mM	Tris-HCl, pH 6.8
	15	% (v/v)	Glycerin
	5	% (w/v)	SDS
	5	% (v/v)	β-Mercaptoethanol
	12.5	% (w/v)	Bromphenolblau
Elektroden-Puffer:	192	mM	Glycin
	25	mM	Tris-Base,
	0.1	% (w/v)	SDS

Die Elektrophorese erfolgte bis zum Eintritt der Proben in das Trenngel bei 30 Volt. Danach wurde auf 120 Volt erhöht und bis zum Ende der Elektrophorese konstant gehalten.

Tab.4.2 Zusammensetzung von Trenngelen unterschiedlicher Acrylamidkonzentration und des Sammelgels.

	Trenngel 12.5 %ig	Trenngel 15 %ig	Sammelgel 5 %ig
40 % Acrylamid	3.9 ml	4.7 ml	1.25 ml
1 M Tris-HCl, pH 8.8	4.7 ml	4.7 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6.8	-	-	1.25 ml
H₂O_{bidest}	3.7 ml	2.9 ml	7.3 ml
10 % SDS	125 µl	125 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow (1987)

49.5 % Acrylamid-Lösung:	48	% (w/v)	Acrylamid
(49.5 % T, 3 % C)	1.5	% (w/v)	Bisacrylamid
Gel-Puffer:	3	M	Tris-HCl, pH 8.45
	0.3	% (w/v)	SDS
Kathoden-Puffer:	0.1	M	Tris-Base
	0.1	M	Tricin
	0.1	% (w/v)	SDS
Anoden-Puffer:	0.2	M	Tris-HCl, pH 8.9
Probenauftrags-Puffer:	50	m M	Tris-HCl, pH 6.8
	4	% (w/v)	SDS
	12	% (w/v)	Glycerin
	2	% (v/v)	2-Mercaptoethanol
	0.01	% (w/v)	Serva Blue G

Zur besseren Auftrennung von Proteinen mit einer Molmasse <10 kDa wurde das Elektrophoresesystem nach Schägger und von Jagow verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte bis zum Eintritt der Proben in das Trenngel bei 30 Volt. Danach wurde die Spannung auf 85 Volt erhöht und bis zum Ende der Elektrophorese konstant gehalten.

Tab.4.3 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels nach Schägger und von Jagow, 1987.

	16.5 %iges Trenngel (16.5 % T, 3 % C)	4 %iges Sammelgel (4 % T, 3 % C)
49.5 % Acrylamid	3.55 ml	0.5 ml
Gel-Puffer	5 ml	1.55 ml
Glycerin	2 g	-
H₂O_{bidest}	ad 15 ml	ad 6.25 ml
10 % APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

4B.5 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

4B.5.1 Silberfärbung von Proteinen

Zum Nachweis von Proteinmengen im Nanogramm-Bereich wurden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine mit einer modifizierten Vorschrift nach Blum, 1987 angefärbt. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das Polyacrylamidgel über Nacht in 50 ml 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure unter Zugabe von 25 µl 37 %iger Formalin-Lösung geschwenkt. Die nachfolgenden Reaktionsschritte wurden mit jeweils 50 ml der entsprechenden Lösung in einer Plastischale unter Schütteln durchgeführt. Dabei wurde nach folgendem Schema vorgegangen und nach jedem Reagenzwechsel eine neue, saubere Plastischale verwendet.

Waschen des fixierten Gels	50 %	Ethanol	2 x 20 min
	30 %	Ethanol	20 min
Vorbehandlung des Gels	0.8 mM	Natriumthiosulfat	1 min
Waschschritt		H ₂ O _{bidest}	3 x 30 sec
Silberimprgnierung	0.1 g	AgNO ₃	20 min
	37 µl	37 % Formalin	
Waschschritt		H ₂ O _{bidest}	2 x 30 sec
Entwicklung	3 g	Kaliumcarbonat	bis zur Färbung der
	25 µl	37 % Formalin	Proteinbanden, mehrmals wechseln

Waschschrift		H ₂ O _{bidest}	2 x 2 min
Reaktionsstopp	30 %	Ethanol	10 min
	10 %	Essigsäure	
Waschschrift	50 %	Methanol	1 h

Vor dem Trocknen der Gele zwischen Cellophanpapier wurden diese 30 min in 30 %igem Methanol und darauf in 3 %iger Glycerin-Lösung geschwenkt.

4B.5.2 Standard-Coomassie Blau-Färbung

Die Gele wurden mindestens 30 min unter Schütteln mit der Färbelösung angefärbt. Anschließend wurde unter mehrmaligem Wechseln solange in der Entfärbelösung geschüttelt, bis die Proteinbanden gegen den Gelhintergrund sichtbar wurden

Färbelösung:	0.25 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
	45 % (v/v)	Methanol
	9 % (v/v)	Essigsäure
Entfärbelösung:	5 % (v/v)	Methanol
	7.5 % (v/v)	Essigsäure

4B.5.3 Coomassie Blau-Färbung nach Neuhoff, 1988

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese mindestens 1 h in der Fixierlösung geschüttelt. Nach der Fixierung wurde 30 sec mit der Waschlösung gespült und anschließend über Nacht mit frisch angesetzter Färbelösung angefärbt. Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes wurden die Gele bis zur vollständigen Entfernung des Hintergrundes in Entfärbelösung geschwenkt. Vor der Archivierung wurden die Gele mindestens 1 h mit dest. Wasser gespült.

Fixierlösung:	12 % (w/v)	Trichloressigsäure
Waschlösung:	8 % (w/v)	Ammoniumsulfat
	1.88 % (v/v)	85 %ige Phosphorsäure
Stammlösung: I	10 % (w/v)	Ammoniumsulfat
	2.35 % (w/v)	85 %ige Phosphorsäure

Stammlösung II	5	% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G-250
Färbelösung	156.8	ml	Stammlösung I
	3.2	ml	Stammlösung II
	ad 200	ml	Methanol, p.a.
Entfärbelösung	25	% (v/v)	Methanol, p.a.

4B.6 Elektrotransfer und Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen

4B.6.1 Western Blot nach Khyse-Anderson, 1984

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen (Western Blot) erfolgte nach dem Verfahren von Khyse-Anderson in einer Semi-Dry-Blot-Apparatur mit Platin/Edelstahl-Elektroden. Hierfür wurden auf die untere Elektrode, die als Anode geschaltet wurde, zwei Lagen Whatman-Papier, getränkt in Anoden-Puffer 1, und darauf zwei Lagen Whatman-Papier, getränkt in Anoden-Puffer 2, gelegt. Als nächstes folgte entweder eine Nitrozellulose- oder eine PVDF-Membran, auf die die Proteine transferiert werden sollten. Beide Membranen wurden vor dem Blot-Aufbau in Anoden-Puffer 2 äquilibriert, die hydrophobe PVDF-Membran musste zusätzlich vor der Äquilibration noch 30 sec mit Methanol benetzt werden. Auf die Membran wurde anschließend das kurz im Kathoden-Puffer geschwenkte Polyacrylamidgel luftblasenfrei gelegt. Die Pufferverbindung zur Kathode wurde durch drei Lagen Whatman-Papier, das in Kathoden-Puffer getränkt war, geschlossen. Der Western Blot wurde bei konstanter Stromstärke von 1.5 mA/cm^2 Gel 1.5 h durchgeführt. Anschließend wurde die Membran getrocknet und entweder mittels Proteinfärbemethoden (4B.6.2) die Transfereffizienz überprüft oder die Membran sofort für Immunfärbungen (4C.6) eingesetzt. Das geblottete Gel wurde im Normalfall nach dem Transfer mittels Coomassie- oder Silberfärbung noch auf im Gel verbliebene Proteine untersucht.

Anoden-Puffer 1:	300	mM	Tris-Base, pH 10.4
	20	% (v/v)	Methanol
Anoden-Puffer 2:	25	mM	Tris-Base, pH 10.4
	20	% (v/v)	Methanol
Kathoden-Puffer:	25	mM	Tris-Base, pH 9.4
	40	mM	ϵ -Aminocapronsäure
	20	% (v/v)	Methanol
	0.1	% (w/v)	SDS

4B.6.2 Färbung von Nitrozellulose-Membranen mit Ponceau S (Harlow and Lane, 1988)

Die reversible Färbung von Proteinen auf Membranen mit Ponceau S ermöglicht es, die Transfereffizienz nach dem Elektrobplot zu überprüfen und für eine spätere Molekularmassen-Zuordnung die Proteinstandard-Banden auf dem Blot zu markieren. Nitrozellulose-Membranen wurden nach dem Elektrotransfer an der Luft getrocknet und anschließend 5 min in der Ponceau S-Färbelösung geschwenkt. Daraufhin wurde die Membran in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen, bis die angefärbten Proteinbanden gut sichtbar wurden. Durch längeres Waschen des Blots konnte die Färbung wieder vollständig entfernt werden

Ponceau S-Färbelösung:	0.2	% (w/v)	Ponceau S
	2	% (w/v)	Trichloressigsäure

4B.6.3 Coomassie-Blau-Färbung von PVDF-Membranen (Matsudaira, 1987)

Die PVDF-Membran wurde direkt nach dem Western Blot 5 min in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde die Membran 15 min in der Entfärbelösung geschwenkt, um unspezifisch gebundenen Farbstoff zu entfernen. Nach dem Trocknen der PVDF-Membran wurden die gebundenen Proteine als blaue Banden sichtbar.

Coomassie-Färbelösung:	0.1	% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
	50	% (v/v)	Methanol, p.a.

Entfärbelösung:	50	% (v/v)	Methanol, p.a.
	10	% (v/v)	Essigsäure, p.a.

4B.7 Präparation von cytosolischen und membranständigen Proteinen aus Schweinegewebe

Zur Isolierung der Proteine TMP und SP 83.5 aus Schweinegehirn wurde schlachtfisches Schweinegehirn verwendet, das vom Schlachthof Bensheim bezogen wurde. Auf dem Rücktransport wurden die Schweinecortex und -cerebellum-Hirnhälften in Eis gelagert und entweder sofort weiterverwendet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4B.7.1 Gewebeaufschluss

Für den Aufschluss wurden 150 g Schweinecerebellum mit dem Skalpell zerkleinert und mit der doppelten Menge an Aufschluss-Puffer versetzt. Mit Ausnahme des als

Metalloproteinase-Inhibitor verwendeten EDTAs, das keinen Abbauvorgängen in wässriger Lösung unterliegt, wurden die verwendeten Proteinase-Inhibitoren immer erst unmittelbar vor dem Gewebeaufschluss dem Aufschluss-Puffer zugegeben.

Danach wurde das Hirngewebe mit dem Ultra-Turrax zerkleinert und das resultierende Homogenisat im SW 28 Rotor 15 min bei 45 000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend noch zweimal im Dounce Homogenisator mit Teflonpistill in 150 ml Aufschluss-Puffer resuspendiert und analog zu den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Die Überstände aus den Zentrifugationsschritten wurden vereinigt und abschließend 90 min bei 120 000 g im SW 28 Rotor sedimentiert. Der Überstand stellt die cytosolische Fraktion des Gehirnaufschlusses dar und wurde entweder direkt in die Ultrafiltration (4B.2.1) eingesetzt oder bei -20°C eingefroren. Die resultierenden Membransedimente wurden mit einem Dounce-Homogenisator in einem möglichst geringen Volumen an Aufschluss-Puffer resuspendiert und in 1 ml-Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Gewebeaufschluss-Puffer:	20	mM	Tris-HCl, pH 7.5
	1	mM	EDTA
	1	mM	Pefabloc SC
	1	μM	Pepstatin
	1	μM	E-64
	10	μM	Leupeptin

4B.7.2 Fraktionierter Gewebeaufschluss nach Whiting und Lindstrom, 1986

40 g Schweinecerebellum wurden in 80 ml Saccharose-haltigem Aufschluss-Puffer A mit einem Ultra-Turrax bei 4°C homogenisiert. Zur Abtrennung der groben Zelltrümmer wurde das Homogenisat 15 min bei 8 000 rpm im SS-34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend 60 min bei 28 500 rpm im SW 28 Rotor in einer Ultrazentrifuge erneut sedimentiert. Das die Membranfraktion enthaltende Sediment wurde noch zweimal mit jeweils 5 ml Aufschluss-Puffer resuspendiert und im SW 41 Rotor bei 28 500 rpm 60 min zentrifugiert. Das nach der Waschprozedur erhaltene Sediment wurde entweder sofort zur Solubilisierung eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Zur Solubilisierung der Membranproteine wurde das Pellet mit dem 0.75 fachen Volumen an Detergens-haltigem Aufschluss-Puffer A, pH 7.2 1 h bei 4°C gerührt. Die Suspension wurde 90 min bei 30 000 rpm im Ti60 Rotor zentrifugiert, der Überstand dekantiert und nochmals 50 min bei 42 000 rpm sedimentiert. Der klare Überstand enthielt die solubilisierten Membranproteine und wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei 4°C gelagert.

Aufschluss-Puffer A:	50	mM	Tris-HCl, pH 8.8
	300	mM	Saccharose
	1	mM	EDTA
	1	mM	Pefabloc SC
	1	μ M	Pepstatin
	1	μ M	E-64
	10	μ M	Leupeptin

4B.7.3 Solubilisierung der homogenisierten Membranfraktion des Gehirnaufschlusses

Um die in der Membranfraktion enthaltenen Membranproteine in Lösung zu bringen, wurden diese mit Hilfe von Detergenzien solubilisiert. Durch die Wechselwirkung der amphiphilen Detergensmoleküle mit den hydrophoben Bereichen der Transmembranproteine werden diese aus dem Membranverband heraus gelöst und liegen in Form von Detergens-Proteinmicellen in der wässrigen Phase vor. Nicht-ionische Detergenzien eignen sich am besten zur Solubilisierung von Membranproteinen, da gewöhnlich Protein-Protein-Wechselwirkungen nicht beeinflusst und die Membranproteine in den seltensten Fällen denaturiert werden. Die Bindung nicht-ionischer Detergenzien beschränkt sich ausschließlich auf die apolaren Proteinbereiche, so dass antigene Proteinbereiche, die sich hauptsächlich in hydrophilen Regionen des Proteins befinden, für die Wechselwirkung mit Antikörpern erreichbar bleiben. Zur Optimierung der Solubilisierung wurden verschiedene nicht-ionische Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und die resuspendierten Membransedimente (4B.7.1) mit 10 %igen Detergens-Stammlösungen auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt. Die Solubilisierungsreaktion fand unter leichtem Schütteln der Reaktionslösung 1 h bei 4 °C statt. Anschließend wurde 60 min bei 100 000 g zentrifugiert werden, um die unlöslichen Zellmembrantrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde entweder als Rohfraktion sofort für weitere Untersuchungen, z. B. Western Blot oder Affinitätschromatographie, verwendet oder bei 4 °C in Gegenwart von Proteaseinhibitoren gelagert.

4C Immunologische Methoden

4C.1 Lagerung von Seren und Antikörpern

Immunseren und isolierte Antikörper wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Lösungen wurde vermieden, da dies zur Aggregation der Antikörper führen kann; einmal aufgetaute Antikörper-Lösungen konnten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mindestens 1 Monat gelagert werden. Um mikrobielles Wachstum in den Arbeitslösungen zu verhindern, wurden diese auf 0.02 % Natriumazid eingestellt. Von der Zugabe von Natriumazid wurde abgesehen, wenn die Antikörperlösung in einem Immunassay mit Meerrettich-Peroxidase verwendet werden sollte, da Natriumazid dieses Enzym inhibiert.

4C.2 Isolierung von Immunglobulinen G (IgGs) aus Kaninchenserum

4C.2.1 Isolierung von IgGs an Protein A-Agarose

Protein A ist ein natürlicher Zellwandbestandteil des Mikroorganismus *Staphylococcus aureus*, der spezifisch an die F_c -Domäne von Antikörpern bindet. An Agarose immobilisiertes Protein A ermöglicht die Reinigung von IgGs aus Kaninchenserum in einem einzigen Chromatographieschritt.

Als Vorreinigungsschritt wurden die Kaninchenseren mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung auf 50 % Ammoniumsulfat eingestellt, um die Immunglobuline von den meisten Serumproteinen abzutrennen. Hierfür wurde zu dem Serum unter Rühren bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ tropfenweise das gleiche Volumen an gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung gegeben und nach der letzten Zugabe noch 1.5 h weitergerührt. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 12 000 rpm in einem SS34 Rotor sedimentiert und in einem möglichst geringen Volumen PBS-Lösung resuspendiert. Zur Entfernung des restlichen Ammoniumsulfats wurde die IgG-haltige Proteinlösung entweder gegen PBS-Lösung dialysiert (4B.3.1) oder durch Gelfiltrationschromatographie mit PD10 oder Nap5 Säulen entsalzt (4B.3.). Die IgG-haltige Lösung wurde langsam auf die Protein A-Agarose-Säule aufgetragen, die zuvor mit dem fünffachen Säulenvolumen an 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 äquilibriert wurde. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit dem zehnfachen Säulenvolumen an 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 und anschließend mit dem zehnfachen Säulenvolumen an 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 gewaschen, um unspezifisch gebundene Serumproteine zu entfernen. Die Elution der IgGs erfolgte durch schrittweise Zugabe von 100 mM Glycin, pH 3.0 in 1 ml-Fractionen. Die Eluate wurden ebenfalls in 1 ml-Fractionen gesammelt, wobei zur Neutralisierung der Proben jeweils 100 μl 1 M Tris-HCl, pH 8.0 in den Sammelgefäßen vorgelegt wurde. Anschließend

wurden die IgG-haltigen Fraktionen durch die Messung der Absorption bei 280 nm identifiziert und die IgG-Konzentration mittels folgender Näherung bestimmt:

$$1 \text{ OD}_{280 \text{ nm}} = 0.8 \text{ mg/ml}$$

Nach der Elution der IgGs wurde die Protein A-Säule noch einmal mit dem fünffachen Säulenvolumen an 100 mM Glycin, pH 2.5 gewaschen und abschließend mit dem zehnfachen Säulenvolumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, das auf 0.02 % Natriumazid eingestellt war, äquilibriert und verschlossen bei 4 °C gelagert.

4C.2.2 Isolierung spezifischer IgGs aus Kaninchenserum

a) Kopplung von Peptiden an eine Agarosematrix

Die verwendeten Peptide wurden über die primäre Aminfunktion der Aminosäure Lysin an eine mit Aldehydgruppen aktivierte 4 %ige Agarosematrix (AminoLink[®] Plus Gel) gekoppelt. Die Reaktion erfolgte in 0.1 M Natriumphosphat-Puffer, der 0.15 M Natriumchlorid enthielt, bei einem pH-Wert von 7.2. Dabei wurden jeweils 2 ml Agarosematrix, die zuvor mit 5 ml Kopplungs-Puffer äquilibriert wurde, mit 2 ml peptidhaltigem Kopplungs-Puffer versetzt. Zur Ausbildung einer stabilen kovalenten Bindung zwischen Matrix und Peptid wurde die bei der Reaktion entstehende Schiffsche Base durch Zugabe von 40 µl einer 5 M Natriumcyanoborhydrid-Lösung zum sekundären Amin reduziert. Die Reaktion fand über Nacht in einer 10 ml-Plastiksäule statt, die langsam über Kopf gedreht wurde. Nachdem die Reaktionslösung aus der Säule abgelassen war, wurde das Gel mit 5 ml Kopplungs-Puffer gewaschen, um nicht kovalent gebundene Peptide zu entfernen. Der Reaktionsdurchbruch und die Waschlösung wurden vereinigt und ihr Peptidgehalt mittels A_{280} -Messung bestimmt. Die Kopplungseffizienz ergibt sich aus dem Vergleich der zur Kopplung eingesetzten Peptidmenge mit der nicht an das Gel gebundenen Peptidmenge. Um noch vorhandene Aldehydgruppen abzusättigen, wurde das Gel mit 4 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.4 gewaschen und erneut reduktiv aminiert (2 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.4 und 40 µl 5 M Natriumcyanoborhydrid, 30 min). Daraufhin wurde das Gel viermal mit 5 ml 1 M Natriumchlorid gewaschen und abschließend zweimal mit 5 ml entgastem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, das auf 0.05 % Natriumazid eingestellt wurde, äquilibriert. Das Peptidagarose-Gel wurde in Natriumazid-haltigem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ in der beidseitig verschlossenen Säule bei 4 °C gelagert.

b) Affinitätschromatographie zur Isolierung von peptidspezifischen IgGs

Die Isolierung der peptidspezifischen Immunglobuline G aus den Kaninchen-Rohseren erfolgte mittels Immunaффinitätschromatographie an den jeweiligen Peptid-Säulen. Hierfür wurden die Rohseren 15 min bei 5 000 g sedimentiert und anschließend mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung 1 h bei 4 °C gefällt. Das Sediment wurde in PBS-Lösung resuspendiert und auf die unter a) beschriebene Peptidsäule aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT wurde der Durchbruch des Säulenlaufs gesammelt und die Säule mit 14 ml PBS-Lösung gespült, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Elution der peptidspezifischen Immunglobuline erfolgte mit 0.1 M Glycin, pH 3.0. Zur sofortigen Neutralisation der Proben wurden diese in Eppendorfgefäße aufgefangen, in denen 50 µl 1 M Tris, pH 9.5 vorlag. Die Antikörper-haltigen Proben wurden mittels A_{280} -Messung identifiziert und vereinigt. Anschließend wurden die Antikörper-Lösungen entweder mittels Dialyse (4B.3.1), Gelpermeationschromatographie (4B.3.2) oder Ultrafiltration in Centricon-Röhrchen (4B.2.1) in PBS-Lösung oder Phosphat-Puffer umgepuffert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

4C.3 Immobilisierung von IgGs an eine Agarosematrix

Die nach (4C.2.2) aus dem Kaninchenserum isolierten IgGs wurden über die am F_c -Teil des Antikörpers vorkommenden Kohlenhydratreste an eine hydrazin-aktivierte Agarosematrix gekoppelt (O'Shannessy, 1990). Hierfür wurden die gereinigten IgGs zuerst in 1 ml Kopplungs-Puffer mit Natriumperiodat 30 min bei RT oxidiert. Dabei werden die vicinalen Hydroxylgruppen der Zuckerreste in reaktive Aldehydgruppen überführt. Anschließend wurden die oxidierten IgGs durch Gelfiltration mit PD10 Säulen entsalzt (4B.3.2) und mit 2 ml CarboLink-Kopplungsgel, das mit Kopplungs-Puffer äquilibriert war, gemischt. Die Kopplungsreaktion der oxidierten IgGs mit den Hydrazinresten zu einer stabilen Hydrazonbindung zwischen den Antikörpern und der Agarose erfolgte in einer Plastiksäule, die über Nacht bei RT über Kopf invertiert wurde. Nach der Reaktion wurde die Reaktionslösung aus der Säule abgelassen und das Gel mit 6 ml Kopplungs-Puffer gewaschen. Die Kopplungseffizienz wurde durch Vergleich des Proteingehalts dieser vereinigten Lösungen mit dem der eingesetzten IgG-Menge bestimmt. Abschließend wurde das Säulenmaterial mit 16 ml 1 M NaCl-Lösung gewaschen und zur Lagerung bei 4 °C mit 16 ml entgastem $H_2O_{bdest}/0.05\%$ NaN_3 äquilibriert.

Kopplungs-Puffer:

0.1 M

Natriumphosphat-Lösung, pH 7.0

4C.4 Affinitätschromatographie zur Isolierung von Proteinen aus Schweinegehirn

Mittels der gemäß (4C.3) hergestellten Immunaффinitätsäulen sollten die Proteinen TMP und SP 83.5 aus Schweinegehirn isoliert werden. Im Folgenden ist das allgemein verwendete Chromatographie-Protokoll vorgestellt. Die jeweils für den speziellen Fall verwendeten Wasch- und Laufpuffer sind im Ergebnis-Teil genau aufgeführt.

Vor dem Probenaufrag wurde die azidhaltige Lagerungslösung entfernt, die Säule mit 8 ml des später verwendeten Elutions-Puffers gewaschen und daraufhin mit 8 ml des Probenaufrags-Puffers äquibriert. Der Probenaufrag erfolgte in 1 ml Volumeneinheiten. Nach dem vollständigen Einlaufen der Probe wurden 200 µl des Auftrags-Puffers aufgegeben, um die obere Säulenfritte vom Probenaufrag zu reinigen. Anschließend wurde das untere Ende der Säule verschlossen und die obere Fritte mit 2 ml Auftrags-Puffer überschichtet. Nach einer Stunde wurde die Säule geöffnet und mit 10 ml Wasch-Puffer gespült, wodurch unspezifisch gebundene Proteine abgetrennt werden sollten. Anschließend wurde das an die Antikörper gebundene Protein mit einem Puffersystem eluiert, das die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper zerstört. Die Protein-haltigen Eluat-Fractionen wurden entweder mittels A_{280} -Messung oder bei Anwesenheit von Detergenzien durch den BCA-Test bestimmt.

Nach der Elution wurde die Immunaффinitätssäule mit 16 ml 1 M NaCl-Lösung gespült, um noch an die Säule gebundenes Protein zu entfernen. Anschließend wurde mit 8 ml entgastem H_2O , das auf 0.05 % Natriumazid eingestellt worden ist, äquibriert. Die Säulen wurden zwischen den Chromatographieschritten bei 4 °C in azidhaltigen, entgastem H_2O aufbewahrt.

4C.5 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Antikörpern wurde in der vorliegenden Arbeit Enzym-gekoppelte Immun-Assays verwendet. Zur Bestimmung des Antikörpertiters der Immunseren wurden die zur Immunisierung eingesetzten Peptide an eine Mikrotiterplatte gekoppelt und die Antikörper aus den Immunseren daran selektiert. Die Menge an spezifisch gebundenen IgGs wurde anschließend mit einem Enzym-gekoppelten anti-IgG-Antikörper bestimmt. Um die verschiedenen Serumauszüge während der Immunisierung bezüglich ihres relativen Peptid-Antikörpergehalts miteinander vergleichen zu können, wurden von jedem Serumauszug serielle Verdünnungen in den Immun-Assay eingesetzt und die Wendepunkte der unterschiedlichen Titrationskurven miteinander verglichen.

4C.5.1 Bestimmung des Antikörpertiters von Immunseren mittels indirektem ELISA

Um den Erfolg der Immunisierung von Kaninchen mit 83.5 spezifischen Peptiden zu verfolgen, wurden die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Immunisierung entnommenen Serumproben mittels indirektem ELISA getestet. Als Negativkontrolle wurde bei jedem Test die Immunreaktion des Serums bezüglich Creatinkinase aus Kaninchen betrachtet. Zu Beginn der Immunisierung wurden die Seren auch mit den vor Beginn des Immunisierungsprogramms entnommenen Seren (Präimmunseren) verglichen, um den signifikanten Anstieg zu dokumentieren.

Am Abend vor dem Test wurden die ELISA-Platten pro Kavität mit 250 ng Peptid oder Protein in 200 µl Beschichtungs-Puffer bestückt und bei 4 °C aufbewahrt. Zur Entfernung von nicht gebundenem Peptid oder Protein wurden die entleerten Platten fünfmal mit 250 µl 1 x PBST-Lösung pro Kavität für 30 sec gewaschen und zwischen den Waschschritten sorgfältig auf Papiertüchern ausgeklopft. Alle Waschschrritte und die folgenden Antikörper- und Substratreaktion wurden unter leichtem Schütteln durchgeführt. Um unspezifische Bindungen der Immunseren zu verhindern, wurden anschließend noch freie Bindungsstellen innerhalb der Kavitäten mit einer 2 %igen BSA-PBST-Lösung (Blockierungslösung, 200 µl) 1 h bei 37 °C abgesättigt. Daran schloss sich ein Waschschrritt wie oben beschrieben an. Für die Erstantikörper-Reaktion der Prä- und Immunseren in unterschiedlicher Verdünnung wurden jeweils 200 µl der Serumsverdünnung in Blockierungslösung verwendet. Das Binden der spezifischen Antikörper an die Antigene erfolgte 2 h bei 37 °C. Anschließend wurde zur Entfernung von überschüssiger Antikörperlösung wie oben beschrieben gewaschen. Zur Identifizierung der gebundenen IgGs aus dem Immunserum wurden jeweils 200 µl einer 1:1000 Verdünnung des anti-Kaninchen-IgG Antikörpers in PBST-Lösung verwendet, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Die Zweitantikörper-Reaktion erfolgte 2 h bei 37 °C. Nach dem Waschen der Platten erfolgte die Detektion des spezifisch gebundenen Zweitantikörpers mit dem POD-Substrat ABTS, das nach der Peroxidasereaktion eine tiefgrüne lösliche Verbindung bildet. Für jeden Test wurde die endgültige Substrat-Lösung aus 28.5 ml Lösung 1, 1.5 ml Lösung 2 und 0.6 ml Lösung 3 frisch angesetzt und jeweils 200 µl pro Kavität verwendet. Die Bildung des grünen Produktes wurde nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 37 °C mittels Extinktionsmessung bei 405 nm im ELISA-Reader detektiert. Die Serumverdünnungen, die eine Absorption von 1 ergaben, wurden als Immuntiter des Serums deklariert. Der Immuntiter des Serums bezüglich eines speziellen Antigens gibt Auskunft über den Anteil an peptidspezifischen Antikörpern und kann zum qualitativen Vergleich des Kaninchenserums während der unterschiedlichen Stadien der Immunisierung verwendet werden.

Beschichtungs-Puffer, pH 9.6:	15 mM	Natriumcarbonat
	35 mM	Natriumhydrogencarbonat
Substratlösung 1:	0.1 M	Citronensäure
	0.1 M	Dinatriumhydrogenphosphat
	mit 10 N Natronlauge auf pH 4.5 einstellen	
Substratlösung 2:	2 %	ABTS in H ₂ O
Substratlösung 3:	0.6 %	Wasserstoffperoxid-Lösung

4C.5.2 Quantitativer Sandwich-ELISA zur Bestimmung der Serum IgG-Konzentration

Zur Bestimmung der Gesamtkonzentration an IgG in Kaninchenserum wurde ein quantitativer Sandwich-ELISA eingesetzt. Alle Inkubationsschritte wurden in 100 µl Lösung pro Kavität sowie alle Waschschritte mit 200 µl pro Kavität durchgeführt. Hierfür wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit jeweils 6 µg Anti-Kaninchen-H&L-IgG Antikörper in Beschichtungs-Puffer (4C.5.1) versehen und über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach dem Entfernen der Beschichtungs-Lösung wurden die Platte dreimal 5 min mit 1 x PBST-Lösung gewaschen und anschließend jede Kavität mit 100 µl 3 %iger BSA/PBST-Lösung 30 min bei RT abgesättigt. Daran schloss sich ein erneuter Waschschritt mit 1 x PBST-Lösung an. Zur Konzentrationsbestimmung der Seren wurde auf der Platte eine Kaninchen-IgG-Konzentrationsreihe vermessen, die ausgehend von 100 ng/ml seriell auf der Platte in Absättigungs-Lösung verdünnt wurde. Zur Minimierung von Pipettierfehlern wurde der Konzentrationsstandard dreifach auf einer Platte hergestellt, vermessen und abschließend die Absorptionsergebnisse gemittelt. Die zu untersuchenden Proben wurden ebenfalls seriell auf der Platte verdünnt. Die Erstantikörper-Reaktion erfolgte 2 h bei RT unter Schütteln. Nach einem weiteren Waschschritt zur Entfernung von überschüssigen IgGs erfolgte die Zweitantikörper-Reaktion mit einer 1:10000 Verdünnung von Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper-POD in Absättigungs-Lösung 2 h bei RT unter Schütteln. Die anschließende Substratreaktion wurde wie bereits unter (4C.5.1) beschrieben durchgeführt. Mit den Absorptionsergebnissen der Standardreihe wurde eine lineare Regression durchgeführt, mit deren Hilfe die Konzentrationen der einzelnen Verdünnungen bestimmt werden konnte.

4C.6 Immunologischer Nachweis von Antigenen auf Blotmembranen

Nach dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen ist der immunologische Nachweis spezifischer Antigene mittels Antikörper auf diesen Membranen möglich. Die Transfereffizienz wird bei der Verwendung von Nitrozellulose-Membranen mittels Ponceau S-Färbung überprüft, wobei gleichzeitig der Proteinstandard zur späteren Größenzuordnung markiert werden kann. Bei Verwendung von PVDF-Membranen wurden diese sofort nach dem Blotten noch feucht zur immunologischen Detektion eingesetzt, während die Nitrozellulose-Membranen für die Dokumentation mit Ponceau S zuerst getrocknet wurden. Zur Verhinderung der unspezifischen Adsorption von Nachweisreagenzien an die Membranen wurden diese mit PBS-Lösung, die 3 % BSA enthielt, abgesättigt. Die Blockierung erfolgte bei PVDF-Membranen aufgrund der hohen Proteinbindekapazität über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C, während bei Nitrozellulose-Membranen ein einstündiges Einwirken der Blockierungslösung ausreichte. Der zum spezifischen Nachweis des Proteins verwendete Erstantikörper wurde entweder in Form des Immunsersums oder als gereinigte IgG-Fraktion in der Blockierungslösung verdünnt und die Membran mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in dieser Lösung geschwenkt. Anschließend wurde die Membran viermal für 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion des spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte mittels eines Zweit-Antikörpers aus Ziege, der an einen kaninchen-spezifischen Bereich des Erst-Antikörpers bindet und an das Reporterenzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist (Anti-Kaninchen-IgG-IgG-alkalische Phosphatase konjugiert). Die Zweit-Antikörperlösung wurde in einer Verdünnung von 1:15000 in TBST-Puffer angesetzt und die Membran 1.5 h bei RT darin geschwenkt. Zur Entfernung von überschüssigem Zweit-Antikörper wurde die Membran erneut viermal für 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und in ein sauberes Plastikgefäß überführt. Da das Aktivitätsmaximum der nachfolgenden Nachweisreaktion im alkalischen pH-Bereich liegt, wurde die Membran durch dreiminütiges Schwenken in aP-Puffer auf einen pH-Wert von 9.5 äquilibriert. Der Immunkomplex wird danach durch die enzymatische Dephosphorylierung von 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und oxidativer Dimerisierung des Zwischenproduktes durch Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT) sichtbar gemacht. Letzteres wird hierbei zum Formazan reduziert, das als violettes Präzipitat ausfällt. Hierfür wurden die Membranen jeweils in einer Substratlösung aus 30 ml aP-Puffer, der 298 µl der NBT-Stammlösung und 99 µl der BCIP-Stammlösung enthielt, solange geschwenkt, bis eine spezifische Immunfärbung eintrat. Danach wurde die enzymatische Farbreaktion durch zehnminütiges Schwenken der Membran in Stopp-Puffer beendet und die Membran vor dem Trocknen noch zweimal für 10 min mit H₂O_{bidest} gespült.

NBT-Stammlösung: 50 mg/ml NBT in 70 %igem DMF

BCIP-Stammlösung: 50 mg/ml BCIP in 100 %igem DMF

4C.7 Immunfluoreszenzanalysen an Gewebeschnitten

Zur zellulären Lokalisation von Proteinen im Gewebeverband wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Dabei wurden die unter (4A.13.2) gewonnenen Gefrierschnitte von Schweinecortex- und cerebellum entweder mit den Peptid-Immunsereen oder zelltypspezifischen Antikörpern untersucht.

Die mit Paraformaldehyd fixierten Gewebeschnitte wurden aus dem Eisfach geholt, mit dem Fön getrocknet und 20 min mit Aceton permeabilisiert. Bei der Verwendung des monoklonalen Anti-GFAP-Antikörpers aus Maus wurde der Permeabilisierungsschritt 10 min mit reinem Ethanol durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 5 min mit 1 x PBS-Lösung gewaschen. Die Absättigung der Schnitte vor der Erstantikörper-Reaktion erfolgt 1 h mit Blockierungslösung in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Schnitte 5 min mit 1 x PBS-Lösung gewaschen. Die Erstantikörper-Reaktion erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C, wobei von den peptidspezifischen Seren eine 1:50 und von dem Anti-GFAP-Antikörper eine 1:400 Verdünnung in Blockierungslösung eingesetzt wurde. Vor dem Aufbringen des Zweitantikörpers, bei dem es sich entweder um mit den Fluorophoren FICT (1:40) oder Texas Red (1:75) gekoppelten Anti-Kaninchen IgG-Antikörper handelte, wurde die Schnitte dreimal 5 min in PBS gewaschen. Die Zweitantikörper-Reaktion erfolgte in 1 %iger BSA/PBS-Lösung 2 h in einer abgedunkelten Kammer, um ein frühzeitiges Ausbleichen der gebundenen Fluorophore zu verhindern. Danach wurden die Schnitte zweimal 10 min mit PBS gewaschen und sofort unter Vectorshield mit Objektgläschen beschichtet und bis zur Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Blockierungslösung:	10 %	Komplettserum aus Ziege
	5 %	Rinderserumalbumin